



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

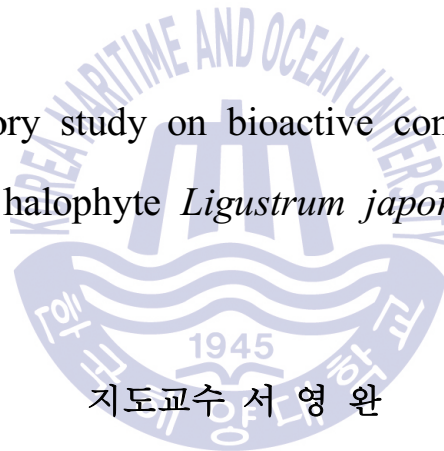
이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

광나무(*Ligustrum japonicum*)로부터  
생리활성 성분의 탐색

An exploratory study on bioactive constituents from  
the halophyte *Ligustrum japonicum*



지도교수 서영완

2015년 8월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

백승오

本 論文을 백승오의 理學博士  
學位論文으로 認准함.

위원장 임 선 영 (인)

위 원 공 창 숙 (인)

위 원 서 영 완 (인)

2015년 8월

한국해양대학교 대학원

## 목 차

	Page
List of schemes -----	i
List of tables -----	ii
List of figures -----	iii
List of abbreviations -----	vi
 Abstract -----	 1
 1. 서론 -----	 4
 2. 재료 및 방법 -----	 6
2-1. 재료 -----	6
2-2. 시약 -----	6
(1) 추출, 분획 및 분리 -----	6
(2) 활성 -----	6
(3) 기기 -----	7
(4) 세포배양 -----	8
2-3. 추출 및 분리 -----	9
(1) 광나무( <i>L. japonicum</i> )의 추출 및 분획 -----	9
(2) 광나무( <i>L. japonicum</i> )의 활성 성분 분리 -----	11
(3) 광나무( <i>L. japonicum</i> )에서 분리된 화합물들의 $^1\text{H}$ NMR -----	14
2-4. 항산화 활성 실험 -----	19
(1) DPPH radical 소거 활성 측정 -----	19
(2) Peroxynitrite 소거 활성 측정 -----	22
(3) 세포 독성 측정 -----	25

(4) 세포내 활성 산소종(ROS) 측정 -----	27
(5) GSH 함량 측정 -----	29
(6) Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 산화 생성물 측정 -----	31
2-5. 암세포 증식 억제 실험 -----	32
(1) MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정 -----	32
2-6. 항염증 활성 실험 -----	33
(1) NO 생성 억제 효과 -----	33
2-7. 통계처리 -----	33
3. 결과 및 고찰 -----	35
3-1. 광나무( <i>L. japonicum</i> )로부터 분리한 물질의 구조 결정 -----	35
3-2. 광나무( <i>L. japonicum</i> )의 <i>In vitro</i> 항산화 활성 -----	38
(1) DPPH radical 소거 활성 -----	38
(2) Peroxynitrite 소거 활성 -----	40
3-3. 광나무( <i>L. japonicum</i> )의 세포 수준에서의 항산화 활성 -----	43
(1) HT-1080 세포에 대한 조추출물과 용매분획물의 독성 효과 -----	43
(2) Raw 264.7 세포에 대한 조추출물과 용매분획물의 독성 효과 -----	45
(3) 세포내 활성 산소종(ROS) 소거 활성 -----	47
(4) 세포내 Glutathione (GSH) 함량 측정 -----	51
(5) Genomic DNA의 산화 생성물 측정 -----	53
3-4. 광나무( <i>L. japonicum</i> )의 인체 유래 암세포에 대한 세포증식 억제 효과 -----	55
(1) HT-1080 세포 증식 억제 효과 -----	55
(2) AGS 세포 증식 억제 효과 -----	55
(3) HT-29 세포 증식 억제 효과 -----	57

(4) MCF-7 세포 증식 억제 효과	57
3-5. 광나무( <i>L. japonicum</i> )의 NO 생성 억제 효과	59
3-6. 광나무에서 분리된 화합물들의 <i>In vitro</i> 항산화 활성	61
(1) DPPH radical 소거 활성	61
(2) Peroxynitrite 소거 활성	63
3-7. 광나무에서 분리된 화합물들의 세포내 항산화 활성	66
(1) HT-1080 세포생존율 측정	66
(2) 세포내 활성 산소종(ROS) 소거 활성	68
(3) 세포내 Glutathione (GSH) 함량 측정	72
(4) Genomic DNA의 산화 생성물 측정	74
3-8. compounds의 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 효과	76
(1) HT-1080 세포 증식 억제 효과	76
(2) AGS 세포 증식 억제 효과	76
(3) HT-29 세포 증식 억제 효과	78
(4) MCF-7 세포 증식 억제 효과	78
4. 요약 및 결론	80
5. 참고문헌	83
부록	90

## List of schemes

	Page
Scheme 1. Preparation of crude extract and its solvent fractions from <i>L. japonicum</i> .	10
Scheme 2. Isolation of the compounds from <i>L. japonicum</i> .	13
Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect.	21
Scheme 4. Measurement of the ONOO <sup>-</sup> scavenging effect.	24



## List of tables

	Page
talbe 1. $^{13}\text{C}$ NMR Spectral data for compounds <b>1-3</b>	15
talbe 2. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR Spectral data for compound <b>4</b>	16
talbe 3. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR Spectral data for compound <b>5</b>	17
talbe 4. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR Spectral data for compound <b>6</b>	18





## List of figures

	Page
Fig. 1. Scavenging of the DPPH radical by phenol.	20
Fig. 2. Peroxynitrite (ONOO <sup>-</sup> ) mediated oxidation of DHR123.	23
Fig. 3. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.	26
Fig. 4. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.	28
Fig. 5. Reaction of monochlorobimane with GSH.	30
Fig. 6. Coloring reaction of NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> detection.	34
Fig. 7. Chemical structure of compounds 1-3 from <i>L. japonicum</i> .	36
Fig. 8. Chemical structure of compounds 4-6 from <i>L. japonicum</i> .	37
Fig. 9. DPPH radical scavenging activity of crude extract and solvent fractions from <i>L. japonicum</i> .	39
Fig. 10. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from <i>L. japonicum</i> on authentic ONOO <sup>-</sup> (% of control).	41
Fig. 11. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from <i>L. japonicum</i> on ONOO <sup>-</sup> from SIN-1 (% of control).	42
Fig. 12. Effects of crude extract and solvent fractions from <i>L. japonicum</i> on viability of HT-1080 cells.	44
Fig. 13. Effects of crude extract and solvent fractions from <i>L. japonicum</i> on viability of Raw 264.7 cells.	46
Fig. 14. Effects of crude extract from <i>L. japonicum</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	48
Fig. 15. Effects of <i>n</i> -hexane and 85% aq.MeOH fractions from <i>L. japonicum</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	49
Fig. 16. Effects of <i>n</i> -BuOH and H <sub>2</sub> O fractions from <i>L. japonicum</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	50
Fig. 17. Effects of crude extract and solvent fractions of <i>L. japonicum</i> on regulation of GSH level in HT-1080 cells.	52

Fig. 18. Antioxidant effect of crude extract and solvent fractions of <i>L. japonicum</i> on genomic DNA in HT-1080 cells.	54
Fig. 19. Effects of crude extract and its solvent fractions from <i>L. japonicum</i> on viability of HT-1080 and AGS cells.	56
Fig. 20. Effects of crude extract and its solvent fractions from <i>L. japonicum</i> on viability of HT-29 and MCF-7 cells.	58
Fig. 21. Effects of crude extract and solvent fractions from <i>L. japonicum</i> on nitrite production in Raw 264.7 cells.	60
Fig. 22. DPPH radical scavenging activity of compounds <b>1-6</b> from <i>L. japonicum</i> .	62
Fig. 23. Scavenging effects of compounds <b>1-6</b> from <i>L. japonicum</i> on authentic ONOO <sup>-</sup> (% of control).	64
Fig. 24. Scavenging effects of compounds <b>1-6</b> from <i>L. japonicum</i> on ONOO <sup>-</sup> from SIN-1 (% of control).	65
Fig. 25. Effects of compounds <b>1-6</b> from <i>L. japonicum</i> on viability of HT-1080 cells.	67
Fig. 26. Effects of compounds <b>1-2</b> from <i>L. japonicum</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	69
Fig. 27. Effects of compounds <b>3-4</b> from <i>L. japonicum</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	70
Fig. 28. Effects of compounds <b>5-6</b> from <i>L. japonicum</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	71
Fig. 29. Effects of compounds <b>1-6</b> of <i>L. japonicum</i> on regulation of GSH level in HT-1080 cells.	73
Fig. 30. Antioxidant effect of compounds <b>1-6</b> of <i>L. japonicum</i> on genomic DNA in HT-1080 cells.	75
Fig. 31. Effects of compounds <b>1-6</b> from <i>L. japonicum</i> on viability of HT-1080 and AGS cells (50, 10, 1 $\mu$ M).	77
Fig. 32. Effects of compounds <b>1-6</b> from <i>L. japonicum</i> on viability of HT-29 and MCF-7 cells (50, 10, 1 $\mu$ M).	79
Fig. 33. <sup>1</sup> H NMR Spectrum of compound <b>1</b> CDCl <sub>3</sub> .	90
Fig. 34. <sup>13</sup> C NMR Spectrum of compound <b>1</b> CDCl <sub>3</sub> .	90
Fig. 35. gDCOSY Spectrum of compound <b>1</b> CDCl <sub>3</sub> .	91
Fig. 36. TOCSY Spectrum of compound <b>1</b> CDCl <sub>3</sub> .	91
Fig. 37. <sup>1</sup> H NMR Spectrum of compound <b>2</b> CD <sub>3</sub> OD.	92
Fig. 38. <sup>13</sup> C NMR Spectrum of compound <b>2</b> CD <sub>3</sub> OD.	92

Fig. 39. gDCOSY Spectrum of compound <b>2</b> CD <sub>3</sub> OD.	93
Fig. 40. TOCSY Spectrum of compound <b>2</b> CD <sub>3</sub> OD.	93
Fig. 41. <sup>1</sup> H NMR Spectrum of compound <b>3</b> CD <sub>3</sub> OD.	94
Fig. 42. <sup>13</sup> C NMR Spectrum of compound <b>3</b> CD <sub>3</sub> OD.	94
Fig. 43. gDCOSY Spectrum of compound <b>3</b> CD <sub>3</sub> OD.	95
Fig. 44. TOCSY Spectrum of compound <b>3</b> CD <sub>3</sub> OD.	95
Fig. 45. <sup>1</sup> H NMR Spectrum of compound <b>4</b> CD <sub>3</sub> OD.	96
Fig. 46. <sup>13</sup> C NMR Spectrum of compound <b>4</b> CD <sub>3</sub> OD.	96
Fig. 47. gDCOSY Spectrum of compound <b>4</b> CD <sub>3</sub> OD.	97
Fig. 48. TOCSY Spectrum of compound <b>4</b> CD <sub>3</sub> OD.	97
Fig. 49. <sup>1</sup> H NMR Spectrum of compound <b>5</b> CD <sub>3</sub> OD.	98
Fig. 50. <sup>13</sup> C NMR Spectrum of compound <b>5</b> CD <sub>3</sub> OD.	98
Fig. 51. gDCOSY Spectrum of compound <b>5</b> CD <sub>3</sub> OD.	99
Fig. 52. TOCSY Spectrum of compound <b>5</b> CD <sub>3</sub> OD.	99
Fig. 53. <sup>1</sup> H NMR Spectrum of compound <b>6</b> CD <sub>3</sub> OD.	100
Fig. 54. <sup>13</sup> C NMR Spectrum of compound <b>6</b> CD <sub>3</sub> OD.	100
Fig. 55. gDCOSY Spectrum of compound <b>6</b> CD <sub>3</sub> OD.	101
Fig. 56. TOCSY Spectrum of compound <b>6</b> CD <sub>3</sub> OD.	101

## List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
c	: concentration
CD <sub>3</sub> OD	: deuterium methanol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: dichloromethane (methylene chloride)
<sup>13</sup> C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
Fig.	: figure
H <sub>2</sub> O	: water
<sup>1</sup> H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
Hz	: herz (sec <sup>-1</sup> )
IC <sub>50</sub>	: 50% inhibitory concentration
IR	: Infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO·	: nitric oxide radical
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: superoxide anion radical
·OH	: hydroxyl radical
ONOO <sup>-</sup>	: peroxynitrite
RNS	: reactive nitrogen species
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
S	: substrate
SiO <sub>2</sub>	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
<i>v</i> <sub>max</sub>	: maximal velocity
SIN-1	: 3-morpholinsydnonimine

# An exploratory study on bioactive constituents from the halophyte *Ligustrum japonicum*

SEUNGOH BAEK

*Division of Marine Environment and Bioscience, Korea Maritime and  
Ocean University, Busan 606-791, Korea*

## Abstract

*Ligustrum japonicum* is distributed along the feet of the mountains adjacent to the coasts of Korea, China and Japan. *L. japonicum* is commonly used as an herbal medicine to strengthen the function of the heart and the liver as well as to treat a ringing in the ears, dizziness and eye pain.

Samples of *L. japonicum* were purchased from ‘Chungmyungyakcho,’ the pharmaceutical company specializing in herbal medicine. Dried samples were extracted twice: with methylene chloride and with methanol (MeOH), respectively. The combined crude extracts were evaporated *in vacuo*, and then the residue was partitioned between water and methylene chloride. The aqueous layer was re-partitioned between H<sub>2</sub>O and *n*-butanol (*n*-BUOH), and then the organic layer (i.e. between 85% aqueous methanol (85% aq. MeOH) and *n*-hexane).

The crude extract and its solvent-partitioned fractions were evaluated for their antioxidant and antiproliferative effects. In the DPPH radical assay system, only the *n*-BuOH fraction showed a significant radical scavenging effect. In the peroxynitrite assay system, the 85% aq.MeOH and the *n*-BuOH fractions showed a strong scavenging effect on both authentic peroxynitrite and peroxynitrite induced from SIN-1. In a cellular system using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) as the fluorescence probe in HT-1080 cells, all tested samples remarkably decreased the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) at the concentration of 100 µg/ml. Among them, the 85% aq.MeOH fraction revealed the strongest scavenging effect.

In the cytotoxicity bioassay system using the MTT reduction method, on the other hand, the crude extract showed a weak cytotoxic effect on all human cancer cells. For the solvent-partitioned fractions, however, the 85% aq.MeOH fraction showed a potent inhibitory effect on the growth of all human cancer cells ( HT-1080, AGS, HT-29, and MCF-7). The *n*-BuOH fraction exhibited a good inhibition effect on the growth of AGS cells at the concentration of 100 µg/ml.

Six known compounds were isolated from *L. japonicum*: Oleanolic acid (1), Maslinic acid (2), Ursolic acid (3), Tyrosol (4), Ligustruocide (5), and 8-(*E*)-Nuezhenide (6). These six compounds were also evaluated for their antioxidant and antiproliferative effects. In the antioxidant bioassay, compound 6 not only showed a potent scavenging

effect on peroxinitrites but also remarkably decreased the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) in HT 1080 cells. In the cytotoxicity test, compound **3** of all tested compounds exhibited the strongest inhibitory effect on growth of HT-1080, AGS, HT-29, and MCF-7 cells.

Therefore, these results suggest that *L. japonicum* may be useful as a potential biomaterial, as a natural antioxidant to alleviate oxygen-induced damage as well as a chemopreventive agent for cancer.



## 1. 서론

현대 사회에서 의료 서비스 개선과 삶의 질의 향상으로 인해 인류의 수명이 연장됨에 따라 심장질환, 암, 당뇨, 정신 질환 등 만성 또는 난치성 질환이 증가하고 있으며, 이러한 질환들의 치료를 위해 사용되는 의약품의 안전성에 대한 관심이 고조되면서, 더불어 천연 유래 의약품에 대한 관심도 증가되었다.

예로부터 인류는 각종 질병과 상처를 치료하기 위한 수단으로 여러 종류의 약초를 이용하여 이를 해결하였으며 시대가 지남에 따라 이렇게 축적된 여러 약초에 대한 지식은 현재 많은 천연 의약품 개발에 지표로 이용되고 있다. 하지만 인류의 수명연장과 새로운 질병의 발생 등으로 인해 새로운 의약품의 개발에 대한 필요성은 급격하게 증가되었으나 오랜 연구에 따른 육상 생물자원의 양과 수는 점점 한계에 이르고 있다. 이를 해결하기 위해 인류는 새로운 원천으로 바다로 눈을 돌리게 되었고, 해양 및 그 주변의 생물자원에 주목하게 되었다.

지구상에 존재하는 생명체 중 약 80%가 해양에 존재하며, 육상 생물종에 비해 해양 생물종에 대해 진행된 연구는 극히 일부분에 불과하므로 그 가능성은 무궁하며 육상 생물과는 다른 환경에서 서식하기 때문에, 육상 생물과 다른 특이한 생화학적 대사산물이 발견될 가능성이 또한 크다고 할 수 있다.

이러한 해양 생물종의 하나로 염생습지에 자생하는 염생식물은 육상식물과 달리 바닷가의 강한 바람, 날리는 바닷물과 해무, 뜨거운 햇빛, 침수, 염분 섞인 지하수 등의 영향을 받는다. 이처럼 혹독한 환경에서 자생하는 염생식물은 그러한 환경에 적응하기 위해 육상의 식물들과는 다른 독특한 생리적 기전을 갖추고 있다. 특히 최근에는 염생습지의 높은 염분성분에



의해 야기된 산화환경은 활성산소종을 빈번히 발생시키기 때문에 염생식물들은 이러한 활성산소종을 제거하기 위한 강력한 항산화기작을 가지고 있는 것으로 보고 되었다(Jayakumar B., *et al.*, 2014).

이러한 염생식물의 독특한 특성과 생물자원으로서의 가치에 대한 관심이 증가됨에 따라 세계 여러 나라에서 이들에 대한 연구가 증가하고 있다. 미국농무성의 Salinity Laboratory에서는 세계의 염생식물 데이터베이스를 만들어 온라인상에서 제공하고 있으며(<http://www.usda.gov/>), 중국에서는 본토 전역에 자생하는 염생식물 목록을 작성해 2002년과 2010년도에 발표했다(Zhao K., *et al.*, 2002; Kefu Z., *et al.*, 2010).

국내에서는 1997년도부터 2002년까지 해수역의 조사대상 중 하나로 염생식물을 조사했고, 《한국의 염생식물 도감》(군산대학교, 2006)이 발간되었으며, 농촌진흥청에서 《한국의 간척지 염생식물(2010)》을 발간하였다(한국의 염생식물 2013).

우리나라에 자생하는 염생식물들중에 해안가의 산기슭에 자생하는 광나무(*L. japonicum*)는 소금을 가장 많이 함유한 나무중 하나로서 예전부터 한방에서는 간과 심장을 강화하고 이명, 현기증, 냉증의 치료에 사용되어 왔다(신 동의학사전 2003). 본 연구에서는 광나무의 추출물을 이용하여 인체 유래 암세포를 이용한 항암효과 및 항산화와 항염증 효과를 탐색하고, 더 나아가 항산화제 및 항암제와 같은 의약품 등의 개발가능성을 알아보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 재료

실험에 사용된 광나무(*L. japonocum*)은 2013년 8월 제주시에서 채취하여 응달에 건조된 건조시료를 청명약초에서 구입하여 사용하였다.

### 2-2. 시약

#### (1) 추출, 분획 및 분리

추출과 분획, 분리에 사용한 용매는 모두 1급 시약을 사용하였다. Column packing materials 는 RP-18 (YMC-Gel ODS-A, 12 mm, S-75  $\mu\text{m}$ )을 사용하였다. HPLC에 사용한 column 은 YMC pack ODS-A (250 $\times$ 10 mm, S 5  $\mu\text{m}$ , 12 mm)를 사용하였고, guard column (7.5 $\times$ 4.6 mm, Alltech)을 사용하였다. NMR 측정 시 용매로는  $\text{CDCl}_3$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%),  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%)를 사용하였다.

#### (2) 활성

항산화 활성 실험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

(DPPH), 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)과 dihydorhodamine 123 (DHR 123), penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methyl-butanoic acid)은 Sigma사(ST Louis, MO, USA)에서 구입하였고 peroxyinitrite ( $\text{ONOO}^-$ )는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양에 필요한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)과 RPMI-1640, FBS (Fetal Bovine Serum)는 Hyclone (Logan, Utah, USA), Trypsin-0.02 % EDTA, 100 units/ml penicillin streptomycin은 GIBCO (USA)사에서 구입하였다. ROS측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. NO에 사용된 MEM (Modified Eagle Medium)은 Sigma사에서 구입하였다.

### (3) 기기

$^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR, two-dimensional NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. Varian RI detector와 high performance liquid chromatography (HPLC, Dionex p580)를 사용하여 화합물을 정제·분리하였다. 항산화 활성 및 MTT 등의 측정에는 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio- TEK instruments, USA)를 사용하였다. 세포의 배양은  $\text{CO}_2$  incubator (Forma Scientific, Japan)를 사용하였고, 그 외에 Rotary evaporator (EYELA, JAPAN), vacuum pump, water bath, pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.

#### (4) 세포배양

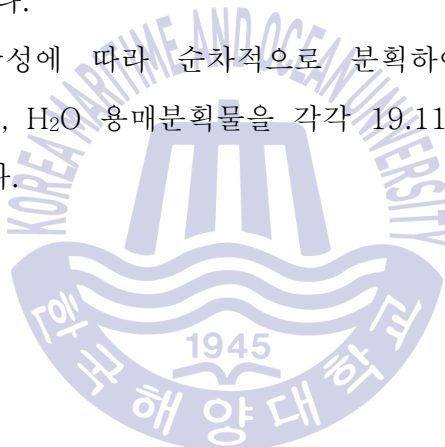
실험에 사용된 AGS (human gastric adenocarcinoma cells), HT-29 (human colon cancer cells), HT-1080 (human fibrosarcoma cells), MCF-7 (human breast cancer cells), Raw 264.7 macrophage 세포는 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양받아 배양하여 실험에 사용하였다. HT-1080, AGS, HT-29는 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였고, MCF-7와 Raw 264.7은 DMEM 배지를 사용하여 배양했으며, 각 배지에는 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가하였다. 실험에 사용된 세포들은 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Forma Scientific, Japan)에서 배양하였으며, 배양된 각각의 암세포는 일주일에 3~4회 배지를 교환하고, 6~7일 만에 PBS로 세척하여 AGS, HT-29, HT-1080, MCF-7은 0.05% Trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양하였고, Raw 264.7은 cell scraper로 분리하여 계대배양하였다.

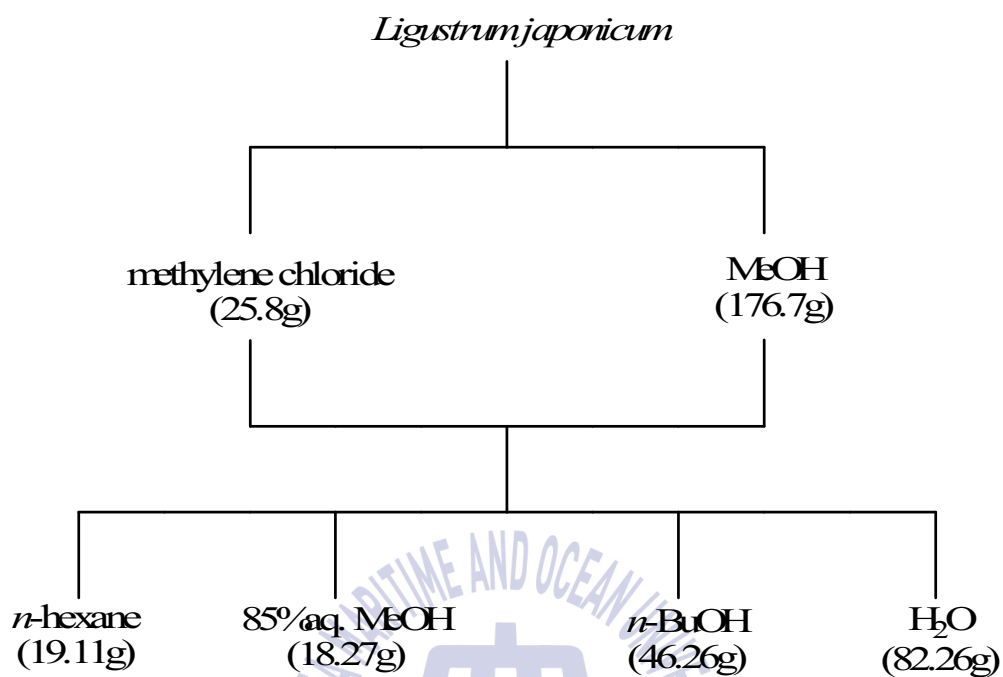
## 2-3. 추출 및 분리

### (1) 광나무(*L. japonicum*)의 추출 및 분획

청명약초에서 구입한 건조된 광나무(*L. japonicum*)를 methylene chloride에 침지시켜 24시간 방치 후 여과하여 추출액을 얻었으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 남은 잔사에 동량의 MeOH 을 첨가하여 동일한 과정으로 추출액을 얻었고, 추출액은 감압농축하여 각각 25.8 g과 176.7 g의 조추출물을 얻었다.

조추출물은 용매극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 용매분획물을 각각 19.11 g, 18.27 g, 46.26 g, 82.26 g을 얻었다.





Scheme 1. Preparation of crude extract and its solvent fractions from *L. japonicum*.

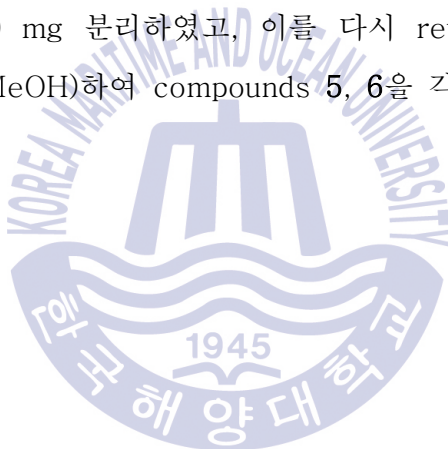
## (2) 광나무(*L. japonicum*)의 활성 성분 분리

85% aq.MeOH 분획물(8 g)을 MeOH과 H<sub>2</sub>O의 혼합용매를 사용하여 C<sub>18</sub> reversed-phase vacuum flash chromatography를 실시하였으며 모두 7개의 fraction (50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq.MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc)을 각각 1.13 g, 1.00 g, 0.47 g, 0.51 g, 0.51 g, 2.58 g, 0.81 g을 얻었다. 그 중 100% MeOH fraction (1.6 g)을 *n*-hexane과 ethyl acetate (EtOAc)의 혼합용매를 사용하여 silica normal-phase vacuum flash chromatography를 하였으며 모두 10개의 분획(100% *n*-hexane, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70% EtOAc/*n*-hexane, 100% EtOAc, 100% MeOH)을 각각 10.2 mg, 10.6 mg, 54.5 mg, 184.7 mg, 180.9 mg, 278.2 mg, 183.3 mg, 134.5 mg, 184.5 mg, 454.3 mg을 얻었다. 이 중 40% EtOAc/*n*-hexane 분획(76 mg)을 reverse-phase HPLC (ODS-A, 95% aq.MeOH)하여 compounds 1과 3을 각각 5.0 mg, 17.6 mg 얻었다.

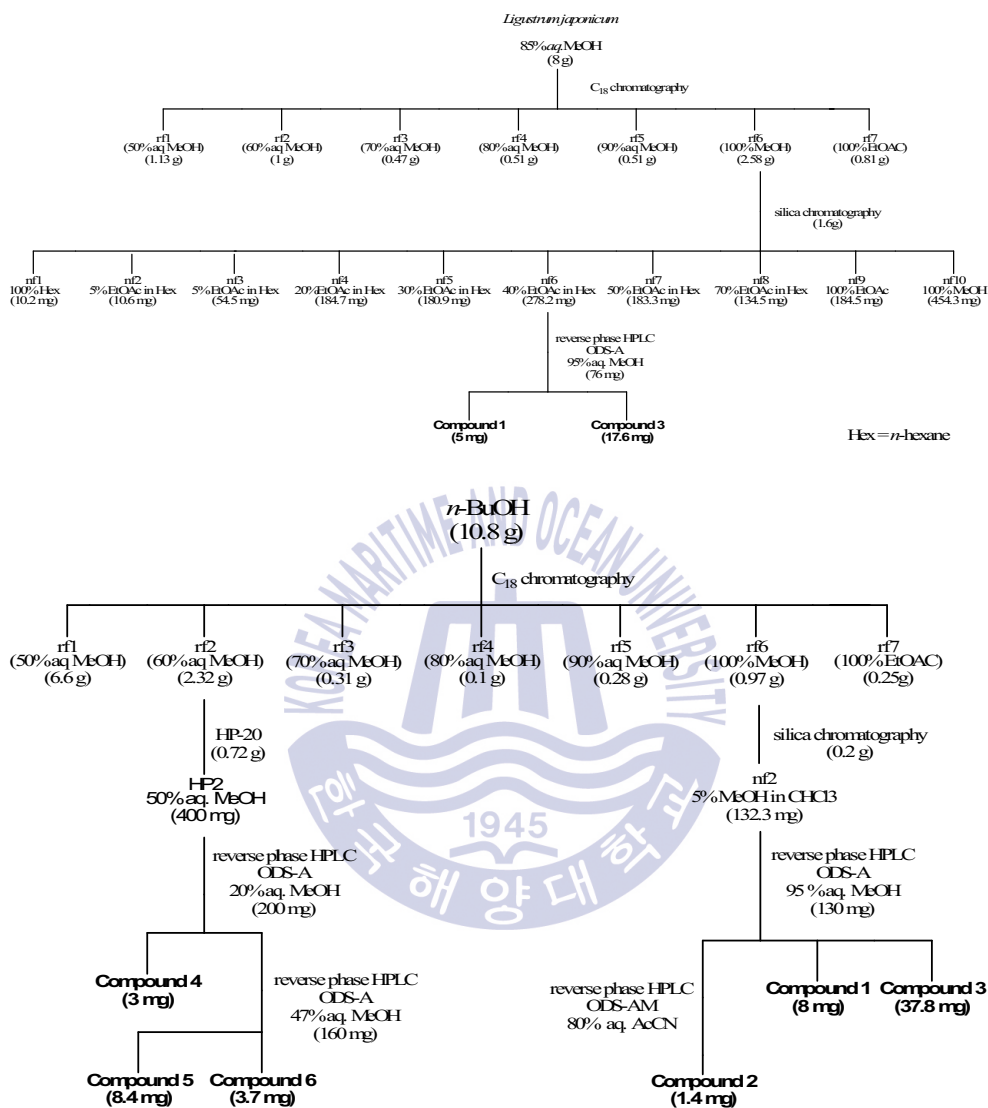
*n*-BuOH 용매 분획물(10.8 g)에 대해서도 85% aq.MeOH 용매 분획물과 유사하게 C<sub>18</sub> reversed-phase vacuum flash chromatography를 실시하였으며 모두 7개의 fraction (50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq.MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc)을 각각 6.60 g, 2.32 g, 0.31 g, 0.10 g, 0.28 g, 0.97 g, 0.25 g을 얻었다. 그중 100% MeOH fraction (200 mg)을 CHCl<sub>3</sub>와 MeOH의 혼합용매를 사용하여 silica normal-phase vacuum flash chromatography를 하여 모두 10개의 분획(100% CHCl<sub>3</sub>, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70% MeOH/CHCl<sub>3</sub>, 100% MeOH, 80% aq.MeOH) 각각 2.4 mg, 132.0 mg, 5.3 mg, 5.0 mg, 2.3 mg, 1.2 mg, 7.0 mg, 8.1 mg, 0.1 mg, 7.8 mg을 얻었다. 그중

5% MeOH/CHCl<sub>3</sub> fraction (130 mg)을 reverse-phase HPLC (ODS-A, 95% aq.MeOH)하여 compounds **1**과 **3**을 각각 8.0 mg, 37.8 mg 분리하였고, 이를 다시 reverse-phase HPLC (ODS-AM, 80% aq.MeOH)하여 compound **2**를 1.4 mg 분리하였다.

*n*-BuOH 분획물의 60% aq.MeOH fraction (0.72 g)을 HP20 column chromatography하여 모두 5개의 분획(100% H<sub>2</sub>O, 50% aq.MeOH, 50% aq. acetone, 100% MeOH, 100% acetone)을 각각 0.12 g, 0.40 g, 0.19 g, 0.01 g, 0.01 g, 0.01 g 얻었다. 이중 50% aq.MeOH fraction (200 mg)을 reverse-phase HPLC (ODS-A, 20% aq.MeOH)하여 compound **4**를 3.0 mg 분리하였고, 이를 다시 reverse-phase HPLC (ODS-A, 47% aq.MeOH)하여 compounds **5**, **6**을 각각 8.4 mg, 3.7 mg 분리하였다.







Scheme 2. Isolation of the compounds from *L. japonicum*.

(3) 광나무(*L. japonicum*)에서 분리된 화합물들의  $^1\text{H}$  NMR

compound **1** :  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ :5.26 (1H, t,  $J = 3.3$  Hz, H-12), 3.20 (1H, dd,  $J = 5.8, 4.7$  Hz, H-3), 2.81 (1H, dd,  $J = 4.1, 9.7$  Hz, H-18), 1.13 (3H, s, H-27), 1.05–2.01 (22H, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22), 0.98 (3H, s, H-23), 0.92 (3H, s, H-29), 0.91 (3H, s, H-25), 0.90 (3H, s, H-30), 0.77 (3H, s, H-26), 0.75 (3H, s, H-24)

compound **2** :  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ :5.24 (1H, t,  $J = 3.6$  Hz, H-12), 3.6 (1H, m, H-2), 2.91 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-3), 1.16 (3H, s, H-23), 1.10–2.01 (23H, H-1, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22), 1.01 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, s, H-25), 0.82 (3H, s, H-26), 0.81 (3H, s, H-29)

compound **3** :  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ :5.21 (1H, t,  $J = 3.6$  Hz, H-12), 3.15 (1H, dd,  $J = 5, 5.7$  Hz, H-3), 2.21 (1H, d,  $J = 11.6$  Hz, H-18), 1.12 (3H, s, H-23), 1.04–2.05 (21H, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22), 0.97 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-26), 0.90 (3H, s, H-24), 0.87 (3H, s, H-29), 0.85 (3H, s, H-30), 0.78 (3H, s, H-25)

Table 1.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral data for compounds **1-3**

No	compounds		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	38.4	48.1	39.9
5	55.2	69.4	27.9
6	18.4	84.4	79.7
7	32.7	40.5	40.4
8	39.3	56.7	56.7
9	47.7	19.6	19.5
10	37.1	33.9	34.4
11	23.5	40.6	40.8
12	122.5	48.1	49.0
13	143.5	39.3	38.1
14	41.6	24.7	17.7
15	27.7	123.2	126.8
16	23.0	145.3	139.5
17	46.6	43.0	43.3
18	41.0	28.9	28.8
19	45.9	24.1	25.4
20	30.8	49.1	49.3
21	33.8	42.8	54.3
22	32.5	47.3	40.4
23	28.2	31.7	40.0
24	15.6	35.0	31.8
25	15.4	33.8	38.1
26	17.2	29.3	29.2
27	26.0	17.1	16.5
28	183.2	17.5	16.1
29	33.1	17.8	17.9
30	23.7	26.5	24.1

Measured in  $\text{CDCl}_3$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table. 2  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral data for compound **4**

No.	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	–	156.6
2	6.67 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.0
3	7.00 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	130.7
4	–	130.8
5	7.00 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	130.7
6	6.67 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.0
7	2.70 (2H, t, $J = 7.1$ Hz)	39.4
8	3.67 (2H, t, $J = 7.1$ Hz)	64.6

Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMBC, and gHMBC experiments.

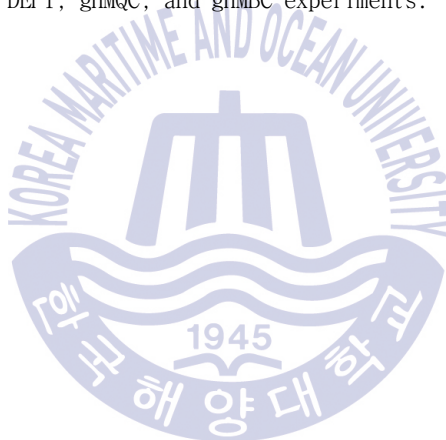


Table. 3  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral data for compound 5

No.	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	5.90 (1H, s)	95.0
3	7.50 (1H, s)	154.9
4	–	109.2
5	4.21 (1H, dd $J = 3, 3.9$ Hz)	31.9
6 <sub>a</sub>	2.42 (1H, dd, $J = 5.0, 9.4$ Hz)	41.2
6 <sub>b</sub>	2.69 (1H, dd, $J = 9.6, 4.4$ Hz)	
7	–	173.0
8	6.05 (1H, q, $J = 7.2$ Hz)	124.7
9	–	130.0
10	1.64 (3H, d, $J = 7.6$ Hz)	13.6
11	–	168.4
12	3.70 (3H, s)	51.9
1'	4.79 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	100.7
2'	3.26–3.46 (6H, m)	74.7
3'	3.26–3.46 (6H, m)	77.9
4'	3.26–3.46 (6H, m)	71.4
5'	3.26–3.46 (6H, m)	78.4
6 <sub>a</sub> '	3.67 (1H, m)	62.7
6 <sub>b</sub> '	3.87 (1H, dd, $J = 10.7, 1.7$ Hz)	
$\alpha$	4.17 (2H, m)	66.9
$\beta$	2.81 (2H, t, $J = 6.9$ Hz)	35.2
1''	–	129.9
2''	7.03 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	130.9
3''	6.69 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.1
4''	–	156.9
5''	6.69 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.1
6''	7.03 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	130.9

Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table. 4  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral data for compound **6**

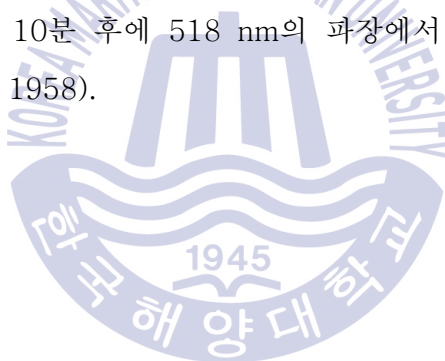
No.	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	5.91 (1H, s)	95.0
3	7.50 (1H, s)	155.0
4	–	109.3
5	3.99 (1H, dd, $J = 4.4, 4.7$ Hz)	31.8
6 <sub>a</sub>	2.48 (1H, dd, $J = 5.5, 8.7$ Hz)	41.3
6 <sub>b</sub>	2.72 (1H, dd, $J = 9.6, 4.7$ Hz)	
7	–	172.8
8	6.07 (1H, q, $J = 6.9$ Hz)	124.8
9	–	130.5
10	1.72 (3H, d, $J = 6.9$ Hz)	13.8
11	–	168.5
12	3.68 (3H, s)	52.0
1'	4.79 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	100.7
2'	3.25–3.47 (7H, m)	74.7
3'	3.25–3.47 (7H, m)	77.9
4'	3.25–3.47 (7H, m)	71.4
5'	3.25–3.47 (7H, m)	78.4
6 <sub>a</sub> '	3.67 (1H, m)	62.7
6 <sub>b</sub> '	3.87 (1H, dd, $J = 11.0, 1.8$ Hz)	
1'''	4.29 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	104.3
2'''	3.20 (1H, dd $J = 8.0, 7.8$ Hz)	75.0
3'''	3.25–3.47 (7H, m)	77.9
4'''	3.25–3.47 (7H, m)	71.5
5'''	3.25–3.47 (7H, m)	75.1
6 <sub>a</sub> '''	4.19 (1H, dd, $J = 6.3, 5.5$ Hz)	65.0
6 <sub>b</sub> '''	4.33 (1H, dd, $J = 9.9, 2.2$ Hz)	
$\alpha_a$	3.69 (1H, m)	72.2
$\alpha_b$	3.93 (1H, t $J = 7.2$ Hz)	
$\beta$	2.82 (2H, t, $J = 6.9$ Hz)	36.4
1''	–	130.3
2''	7.04 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	130.8
3''	6.66 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.0
4''	–	156.6
5''	6.66 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.0
6''	7.04 (2H, d, $J = 8.2$ Hz)	130.8

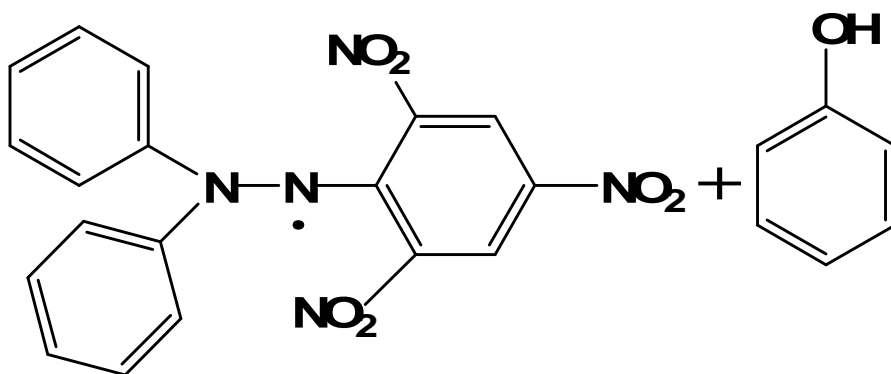
Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

## 2-4. 항산화 활성 실험

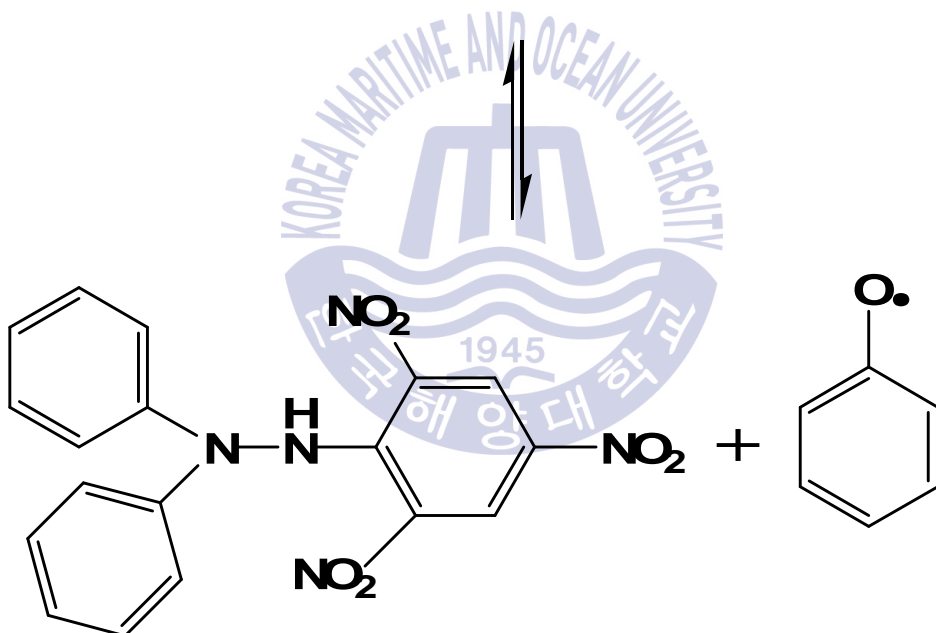
### (1) DPPH radical 소거 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 시약 2 mg 을 ethanol 15 ml 에 녹여 만든 DPPH원액(0.338 M) 1.2 ml 와 3 ml 의 ethanol, 0.5 ml 의 DMSO를 동일 비율로 혼합하여 DPPH radical solution을 준비한다. 준비된 DPPH radical solution을 cuvette에 넣고 518 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 그 측정값이 0.94~0.97이 되도록 농도를 조절한다. 농도를 조절한 DPPH radical solution 900  $\mu$ l 에 준비한 시료 100  $\mu$ l 를 가하여 vortex한 후 10분 후에 518 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하였다(Fig. 1.)(Blois, 1958).





**DPPH • (Violet, 518 nm)**



**Diphenylpicrylhydrazine  
(yellow)**

**Phenoxy  
radical**

Fig. 1. Scavenging of the DPPH radical by phenol.



MeOH solution of sample  
at various concentrations

Solution of DPPH (2 mg)  
in MeOH (15 mL)

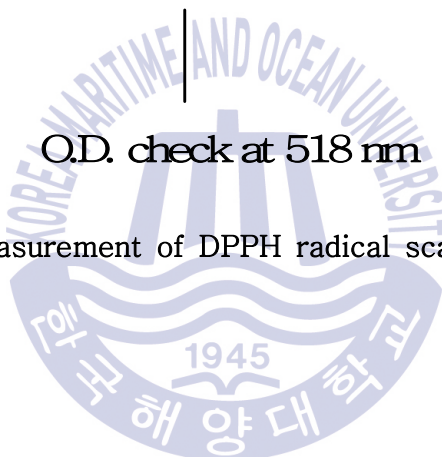


Shaking vigorously (10–20 sec)

Standing at room temperature for 10 min.

O.D. check at 518 nm

Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect.



## (2) Peroxynitrite 소거 활성

ONOO<sup>-</sup> 소거 활성은 dihydrorodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다. DHR 123은 dimethylformamide에 녹여 질소로 purge시켜 -80℃에 보관하였고, DHR 123 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서 조제하여 사용하였다. Buffer는 90 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합하여 pH를 7.4로 조절하여 100 μM DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid)를 혼합하여 냉장보관하였고, buffer로 DHR 123을 5 μM로 희석하여 실험에 사용하였다. DHR 123 buffer 용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치 후, Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실시하여 1시간동안 방치한 후 측정하였다. 이는 SIN-1이 NO•와 O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>를 동시에 발생시켜 ONOO<sup>-</sup>를 생성시키는 화합물로, authentic peroxynitrite의 급속한 DHR 123의 산화와는 달리 점진적으로 산화가 일어나게 하기 때문이다. 0.3 N NaOH를 blank로 사용하였고, 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다(Fig. 2)(Kooy *et al.*, 1994).

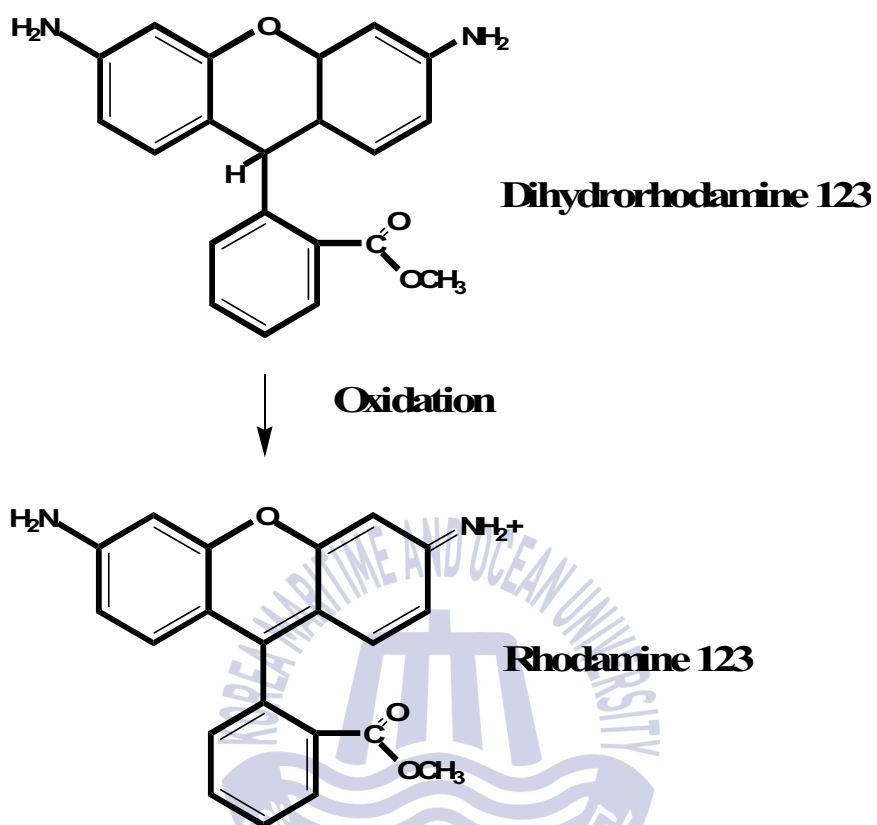


Fig. 2. Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) mediated oxidation of DHR 123.

**100  $\mu$ M Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)**



**5  $\mu$ M Dihydrorhodamine 123**



**Incubation at 37 °C for 1 min**



**Sample treatment**



**200  $\mu$ M SIN-1 or 5  $\mu$ M peroxynitrite**

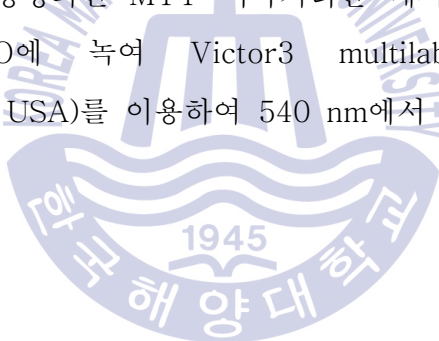


**Measurement of fluorescence intensity**  
**Excitation wavelength at 480 nm**  
**Emission wavelength at 525 nm**

Scheme 4. Measurement of the ONOO<sup>-</sup> scavenging effect.

### (3) 세포 독성 측정

광나무로부터 얻은 물질이 HT-1080세포에 대한 cell viability에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]시약을 이용하여 확인하였다. 배양한 세포를 각각 cell counting하여 96 well micro-plate에  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 갈아준 후 농도별로 준비한 시료를 각 well에 처리하여 다시 1시간 배양하였다. 시료를 처리하여 배양된 세포는 배지를 제거한 뒤, 1 mg/ml농도의 MTT 시약을 처리하여 4시간 배양하였다. formazan이 형성되면 MTT 시약처리한 배지를 제거 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig. 3).



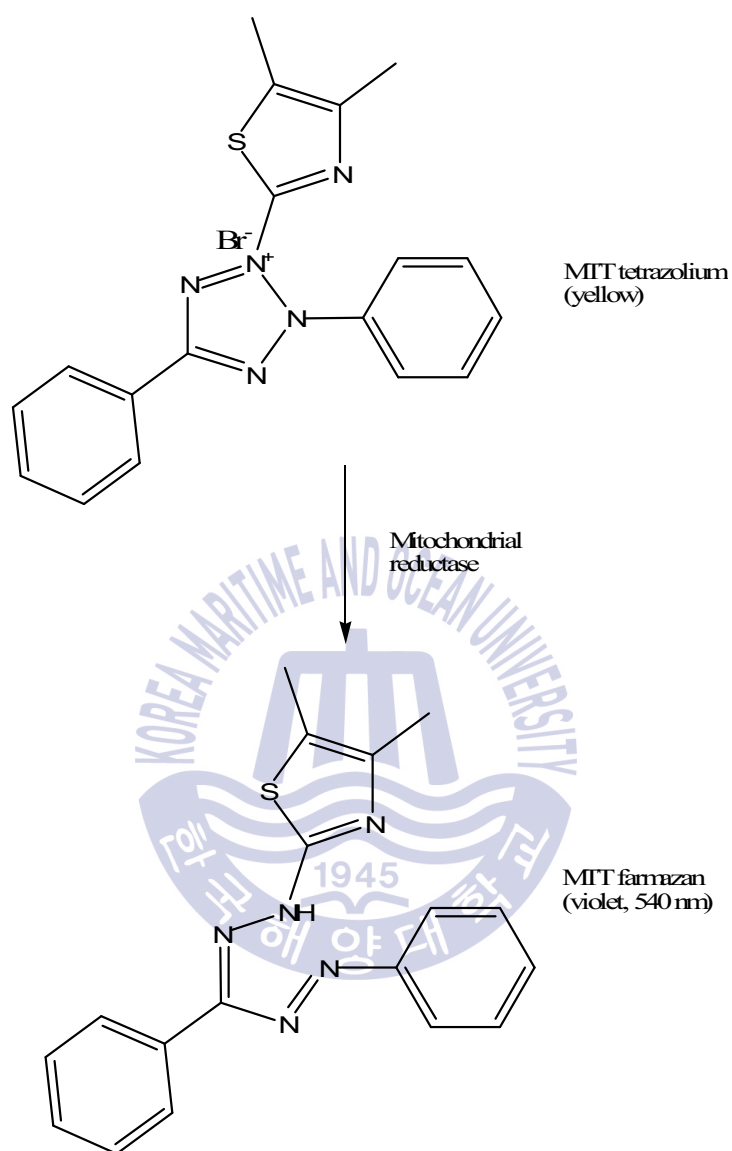
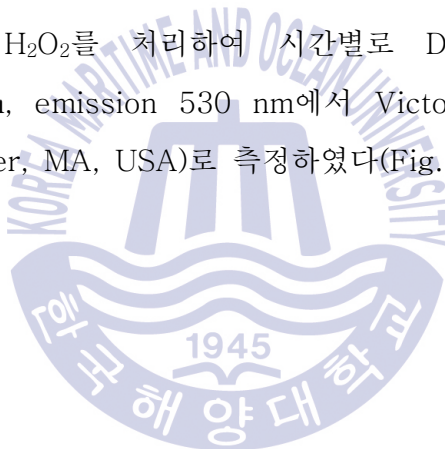


Fig. 3. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.

#### (4) 세포내 활성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 측정

세포내 ROS free radical 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다 (Okimotoa., 2000). HT-1080 세포를 96 well micro-plate에  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 씻은 후 20 μM DCFH-DA를 각 well에 처리하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA를 제거하고 PBS로 씻은 후 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)로 측정하였다(Fig. 4).



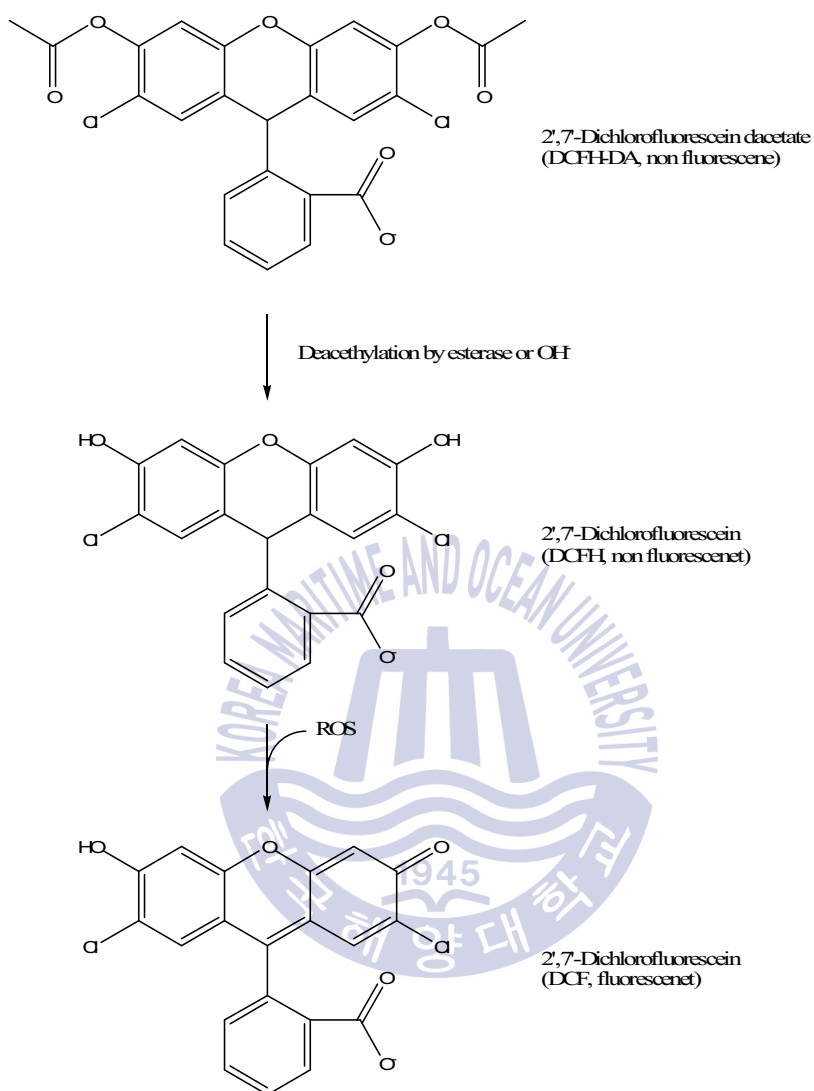


Fig. 4. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.



## (5) Glutathione (GSH) 함량 측정

세포내 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다. 세포는 fluorescence microtiter 96-well plate에 well당  $1 \times 10^7$  cell/ml가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 배양하였다. 각 well은 PBS buffer로 씻은 후 40 μM mBBr을 처리하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 반응시킨 뒤, 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 excitation 360 nm, emission 465 nm에서 형광분석기로 측정하였다(Fig. 5.).



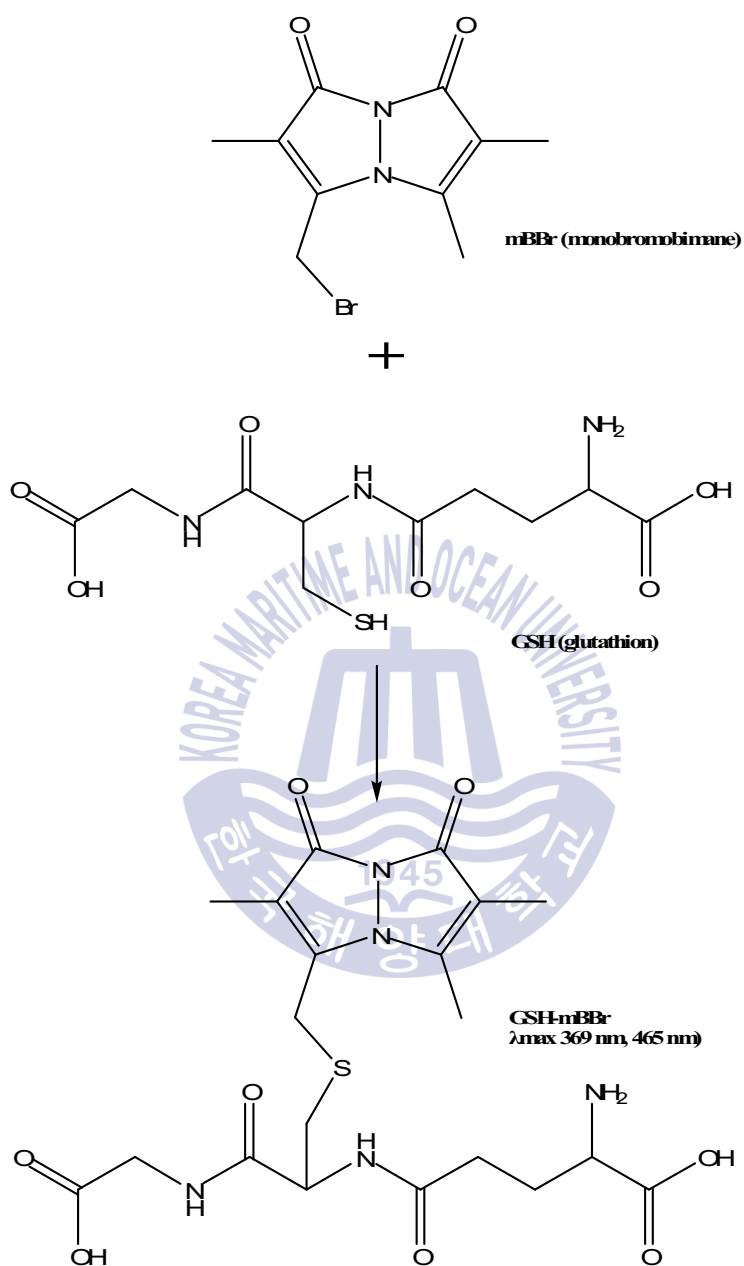
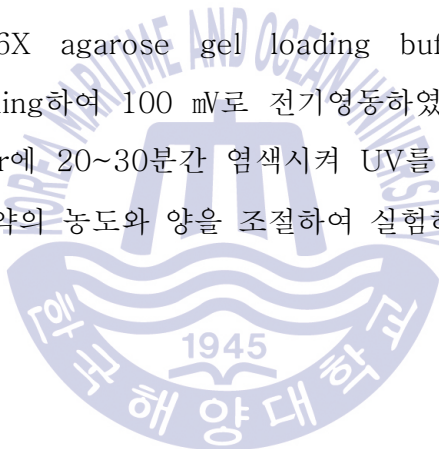


Fig. 5. Reaction of monochlorobimane with GSH.

## (6) Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 산화 생성물 측정

실험에 사용한 genomic DNA는 AccuPrep<sup>®</sup> Genomic DNA Extraction kit (Bioneer Inc., USA)를 이용하여 HT-1080 세포로부터 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하여 순도와 농도를 정량한 후, -20℃에서 냉동보관하여 사용하였다.

0.5~1.0 µg의 genomic DNA에 4 µl의 H<sub>2</sub>O와 600 µM의 FeSO<sub>4</sub>, 0.5 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 각각 10 µl씩 가하여 genomic DNA를 30분간 상온에서 산화시킨 뒤 130 mM의 EDTA를 가하여 반응을 중지시켰다. 산화된 genomic DNA는 6X agarose gel loading buffer와 mix하여 1% agarose gel에 loading하여 100 mV로 전기영동하였다. 전기영동을 마친 gel은 5 µg/ml EtBr에 20~30분간 염색시켜 UV를 통해 산화된 정도를 확인하여 사용된 시약의 농도와 양을 조절하여 실험하였다.



## 2-5. 암세포 증식 억제 실험

### (1) MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

광나무로부터 얻은 물질에 대한 암세포 증식 억제 효과를 확인하기 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]시약을 이용하여 암세포 증식 억제율을 측정하였다.

배양된 암세포는  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 뒤, 새 배지로 교체하여 시료를 처리한 후 다시 24시간동안 배양하였다. 시료처리 후 배양된 암세포에 1 mg/ml의 MTT 시약을 처리하여 4시간동안 배양하여 formazan이 형성되면 MTT시약이 처리된 배지를 제거한 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율(%)을 구하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

## 2-6. 항염증 활성 실험

### (1) NO 생성 억제 효과

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에  $1 \times 10^4$  cells/ml로 well당 100  $\mu$ l씩 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 Modified Eagle Medion (MEM)으로 교체한 뒤 준비된 시료를 처리한 후 1시간동안 배양하였다. 그 뒤, NO 생성을 유도하기 위해 1  $\mu$ g/ml (1 ppm)의 LPS를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간동안 배양하였다. LPS에 의해 자극받은 Raw 264.7세포로부터 생성된 NO가 함유된 배지 50  $\mu$ l와 Griess 시약(0.1% N-1-naphtylenediamine : 1% sulfanilamide = 1 : 1) 50  $\mu$ l를 반응시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 6.)(Beda *et al.*, 2005).

### 2-7. 통계처리

실험결과는 각 항목에 따라 Mean  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었고, 분석된 실험 결과는 대조군과 비교를 위하여 statistica program을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.

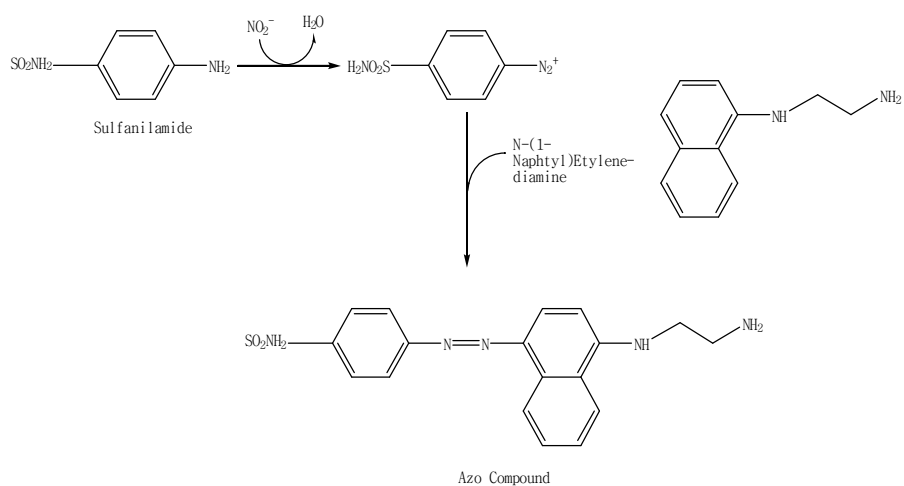


Fig. 6. Coloring reaction of  $\text{NO}_2^-$  detection.



### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 광나무(*L. japonicum*)로부터 분리한 물질의 구조 결정

compounds **1-3**은 흰색의 고체 형태로 분리 되었으며, 이 화합물들의 화학구조는 2D NMR 실험을 이용하여 각각 Oleanolic acid, Maslinic acid, Ursolic acid로 결정되었으며 얻어진 NMR의 chemical shift 값은 문헌에 보고된 값과 잘 일치하였다(Werner S., *et al.*, 2003; Ibrahim T. B., *et al.*, 2013; Andres G. G., *et al.*, 1998).

compounds **4-6**은 황색의 점성형태로 NMR data의 chemical shift 값을 문헌값과 비교한 결과, compound **4**는 Tyrosol, compound **5**와 **6**은 secoiridoids 유도체들인 Ligustroside, 8-(*E*)-Nuezhenide로 결정되었다 (Oswaldo G. L., *et al.*, 2007; Kuwajima *et al.*, 1989; Sung H. S., *et al.*, 2006).

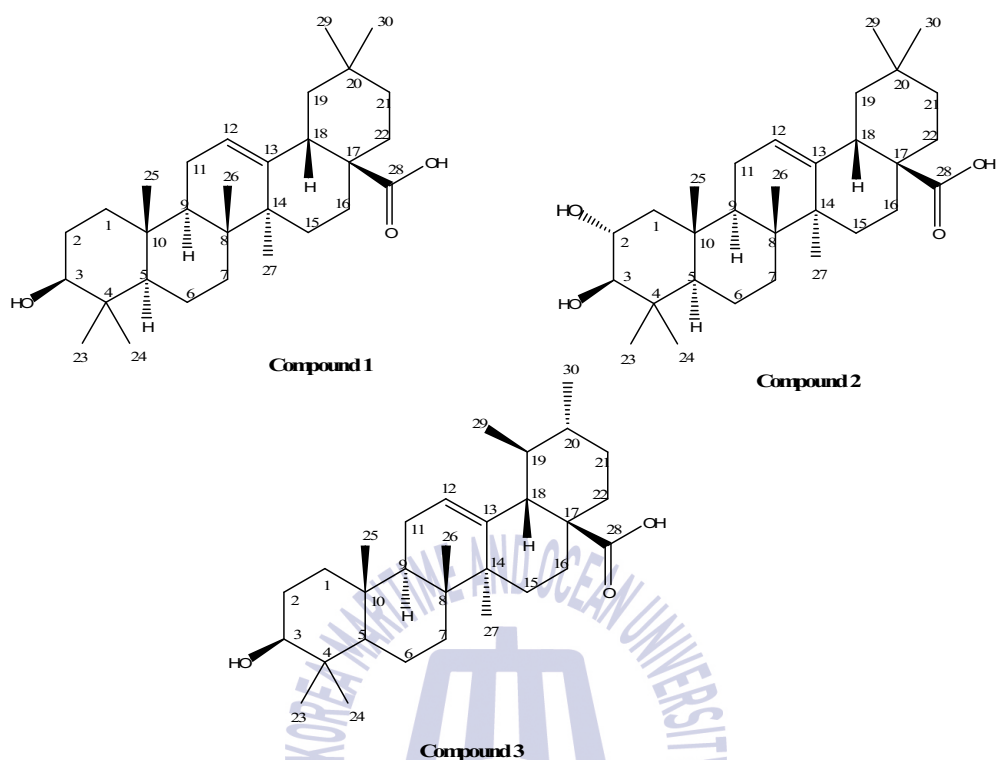
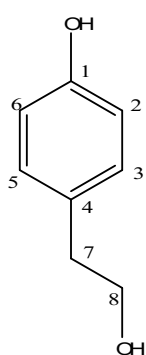
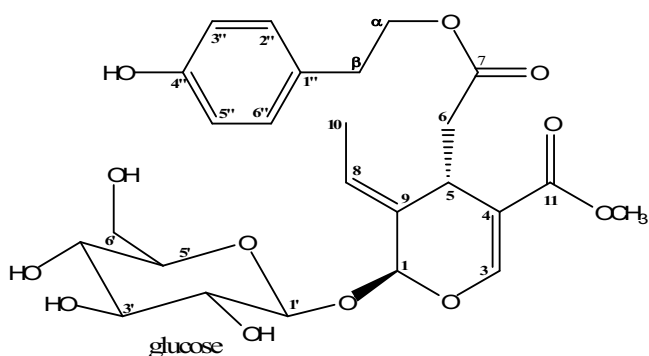


Fig. 7. Chemical structure of compounds 1-3 from *L. japonicum*.

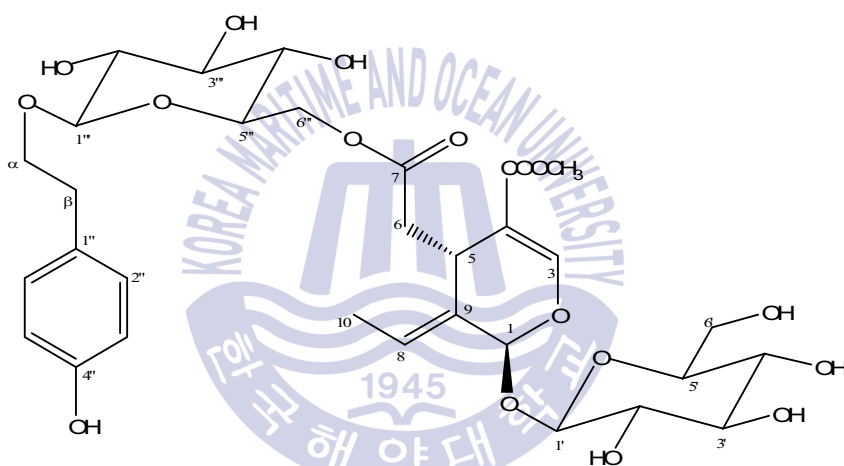




**Compound 4**



**Compound 5**



**Compound 6**

Fig. 8. Chemical structure of compounds 4-6 from *L. japonicum*.

### 3-2. 광나무(*L. japonicum*)의 *In vitro* 항산화 활성

#### (1) DPPH radical 소거 활성

광나무를 methylene chloride와 methanol (MeOH)로 각각 추출하여 혼합한 조추출물(crude extract)과 이를 용매 극성에 따라 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O순으로 순차적으로 분획하여 얻어진 용매 분획물을 각각 200, 100, 50, 10, 1 µg/ml의 농도로 희석한 후 DPPH radical 활성을 측정하였다. 대조군으로는 BHA (butylated hydroxyanisole)와 BHT (butylated hydroxy toluene) 그리고 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 시료와 동일한 농도로 희석하여 사용하였다.

측정결과, L-ascorbic acid는 각 농도에서 89.3, 89.1, 89.4, 27.6, 2.4%를 BHA는 82.4, 69.3, 47.1, 13.5, 4.4%를, BHT는 55.5, 32.5, 20.8, 7.2, 4.7%의 소거능을 보였다. 조추출물은 9.2, 7.0, 4.9, 4.3, 2.6%의 낮은 소거능을 보였다. 용매분획물중에서 *n*-hexane 분획층은 6.2, 5.1, 4.5, 4.3, 3.1%의 소거능을, 85% aq.MeOH 분획층은 9.1, 6.2, 4.7, 4.4, 3.9%의 소거능을, *n*-BuOH 분획층은 29.6, 19.6, 11.9, 4.6, 2.5%의 소거능을, H<sub>2</sub>O 분획층은 5.0, 3.8, 2.0, 2.4, 1.7%의 소거능을 보였다. *n*-BuOH 분획층만 비교적 괜찮은 활성을 보였고, 나머지 분획층과 조추출물에서는 좋은 활성을 보이지 않았다.

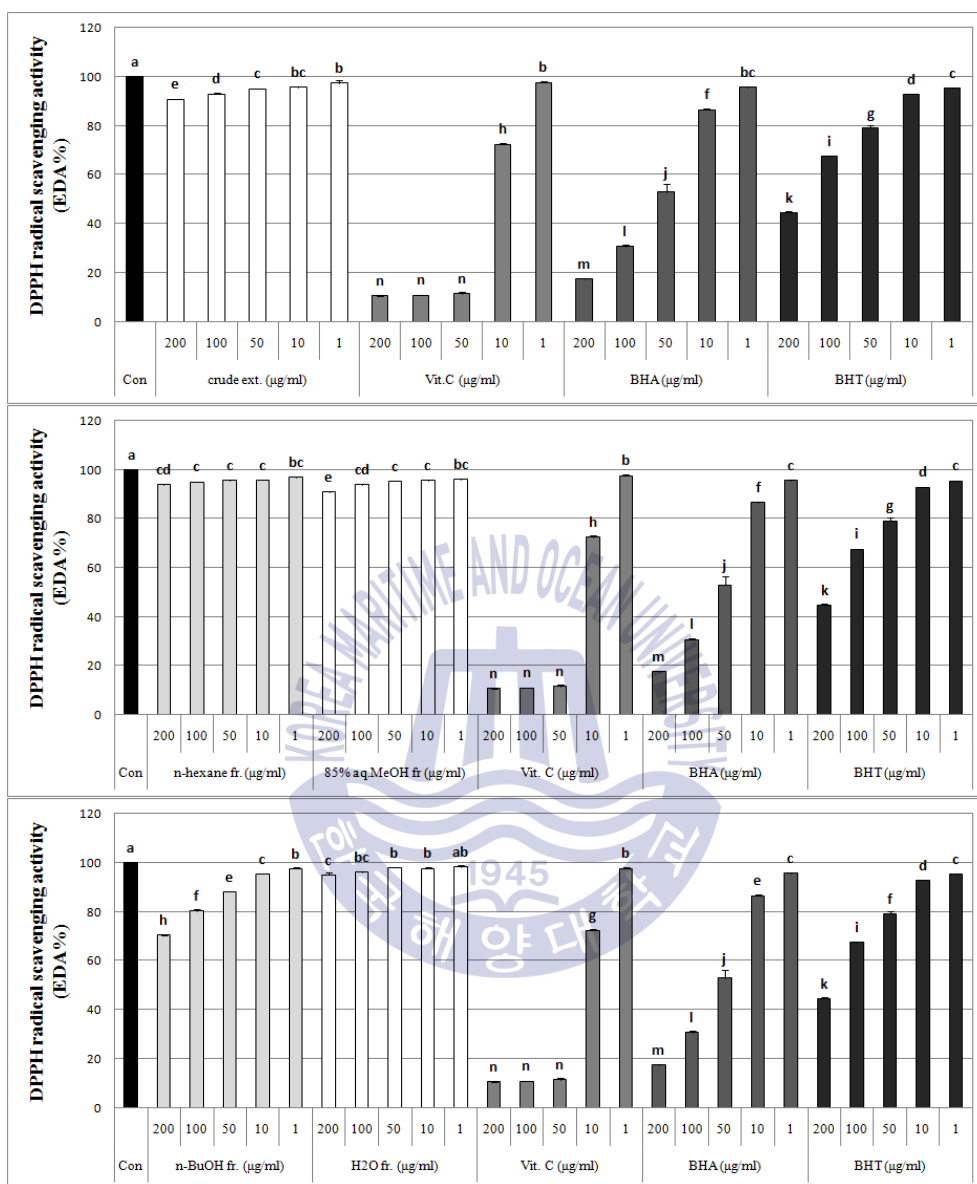


Fig. 9. DPPH radical scavenging activity of crude extract and solvent fractions from *L. japonicum*. <sup>a-n</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## (2) Peroxynitrite 소거 활성

Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )는 DHR 123과 반응하여 형광성 물질인 rhodamine 123으로 바뀌게 되므로, DHR 123에  $\text{ONOO}^-$ 와 SIN-1을 처리한 후 그 반응 생성물의 흡광도를 측정하여 광나무 시료의 peroxynitrite 소거능을 검토하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid와 penicillamine을 사용하였으며, 조추출물과 각각의 용매분획물, 그리고 대조군을 200, 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 사용하였다.

Authentic  $\text{ONOO}^-$ 를 조추출물로 처리하였을 때 좋은 소거 활성을 보였고, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 약 72.5%의  $\text{ONOO}^-$  소거 활성을 나타냈다. 용매분획물에서는 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획물이 높은  $\text{ONOO}^-$  소거 활성을 보였다. 특히 85% aq.MeOH 분획물과 *n*-BuOH 분획물은 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 91.5, 86.2% 이상의 높은  $\text{ONOO}^-$  소거 활성을 나타냈다. 이는 동일한 농도로 보았을 때, 대조군으로 사용한 penicillamine의 92.5% 소거 활성과 큰 차이가 없었다.

SIN-1에서 유도된 peroxynitrite를 조추출물로 처리하였을 때도 좋은 소거 활성을 보였고, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 63.2%의  $\text{ONOO}^-$  소거 활성을 나타냈다. 용매 분획물에서도 역시 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획물에서 뛰어난 활성을 나타내었다. 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획물은 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 94.8, 90.2%의 소거능을 보였으며, authentic  $\text{ONOO}^-$ 를 처리하였을 때와 마찬가지로 동일 농도에서 대조군으로 사용한 penicillamine의 89.0% 소거 활성과 큰 차이가 없었다. 모든 용매분획층이 농도 의존적인 활성을 보여 주었고, 특히 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획층은 대조군과 유사할 정도의 활성을 보여주었다.

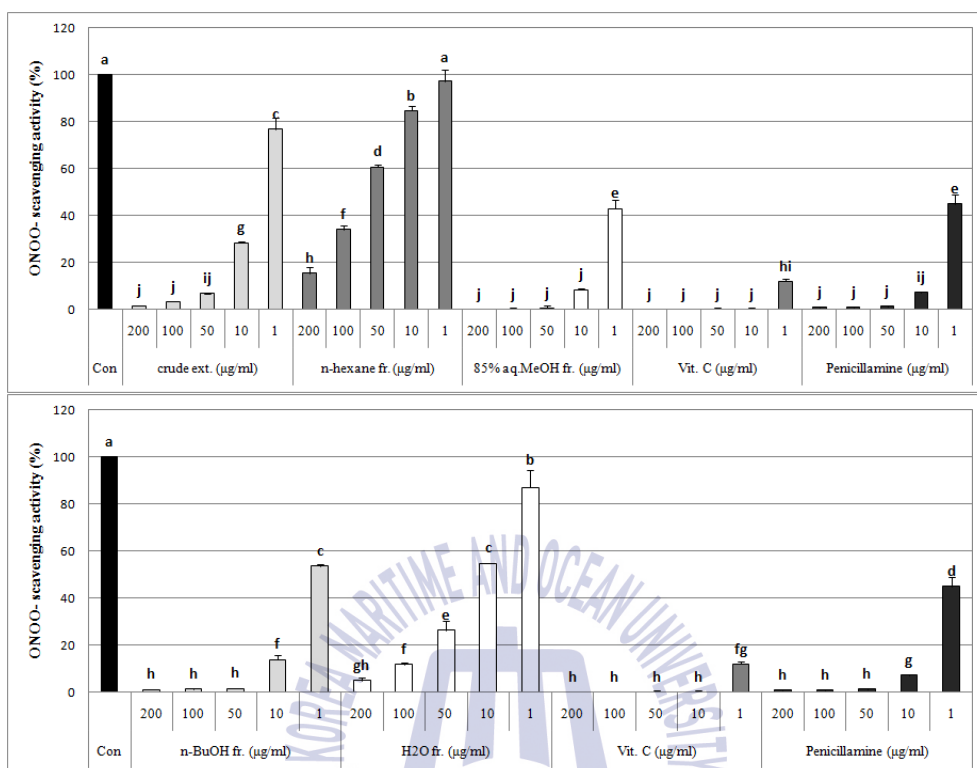


Fig. 10. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from *L. japonicum* on authentic ONOO<sup>-</sup> (% of control). <sup>a-j</sup>Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

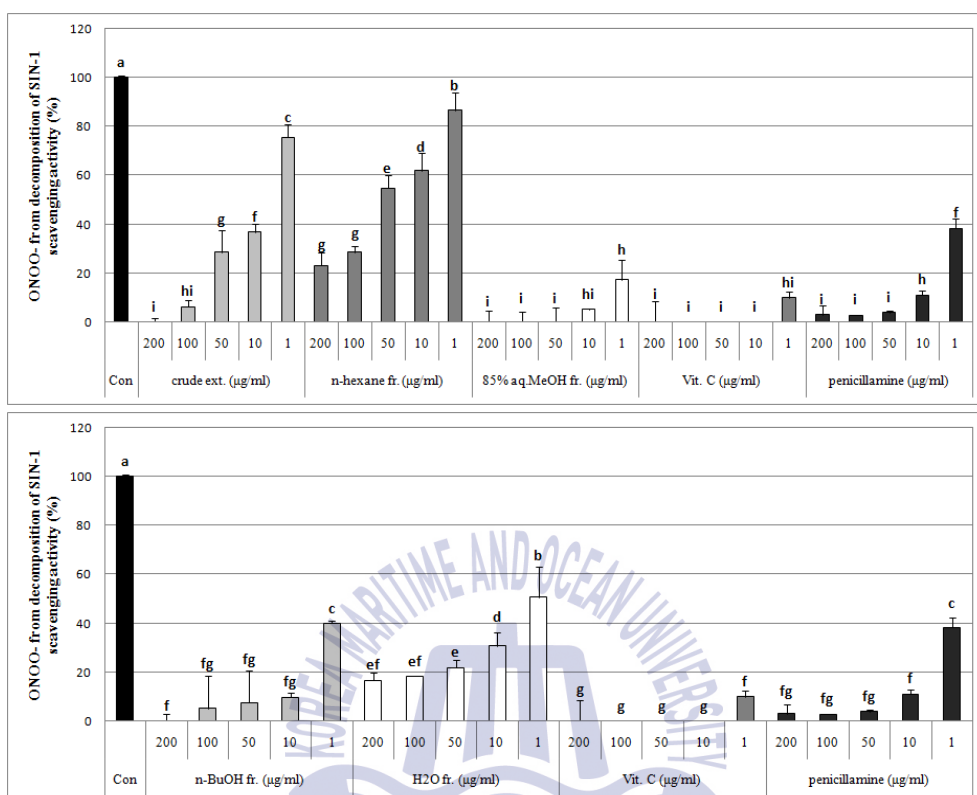


Fig. 11. Scavenging effects of crude extract and its solvent fractions from *L. japonicum* on  $\text{ONOO}^-$  from SIN-1 (% of control). <sup>a-i</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3-3. 광나무(*L. japonicum*)의 세포 수준에서의 항산화 활성

#### (1) HT-1080 세포에 대한 조추출물과 용매분획물의 독성 효과

광나무로부터 얻은 조추출물과 용매분획물의 항산화 활성을 측정하기 위해 먼저 조추출물과 용매분획물이 HT-1080 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통하여 확인하였다. 모든 시료의 농도는 200, 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ 로 희석하여 사용하였으며 조추출물의 경우에는 각각 74.1, 77.8, 82.6, 82.8, 82%의 세포생존율을 나타내었다. 각 용매 분획물의 경우에는 *n*-hexane 분획물이 47.6, 77.8, 91.3, 99.2, 98.6%; 85% aq.MeOH 분획물이 76.4, 84.9, 89.7, 92.3, 93.6%; *n*-BuOH 분획물이 76.5, 83.6, 87.1, 95.3, 95.1%; 그리고  $\text{H}_2\text{O}$  분획물이 83.2, 94.2, 95.3, 98.0, 92.0%의 세포생존율을 각각 나타내었다.

조추출물과 *n*-hexane 분획물의 경우 200, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 그리고 *n*-BuOH, 85% aq.MeOH 분획물은 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포 생존을 억제하는 효과를 보였지만, 그 외의 경우에는 모두 80% 이상의 세포 생존율을 보여 세포 성장에 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이러한 MTT assay 측정결과를 바탕으로 세포 내 항산화 활성 검색을 실시하였다.

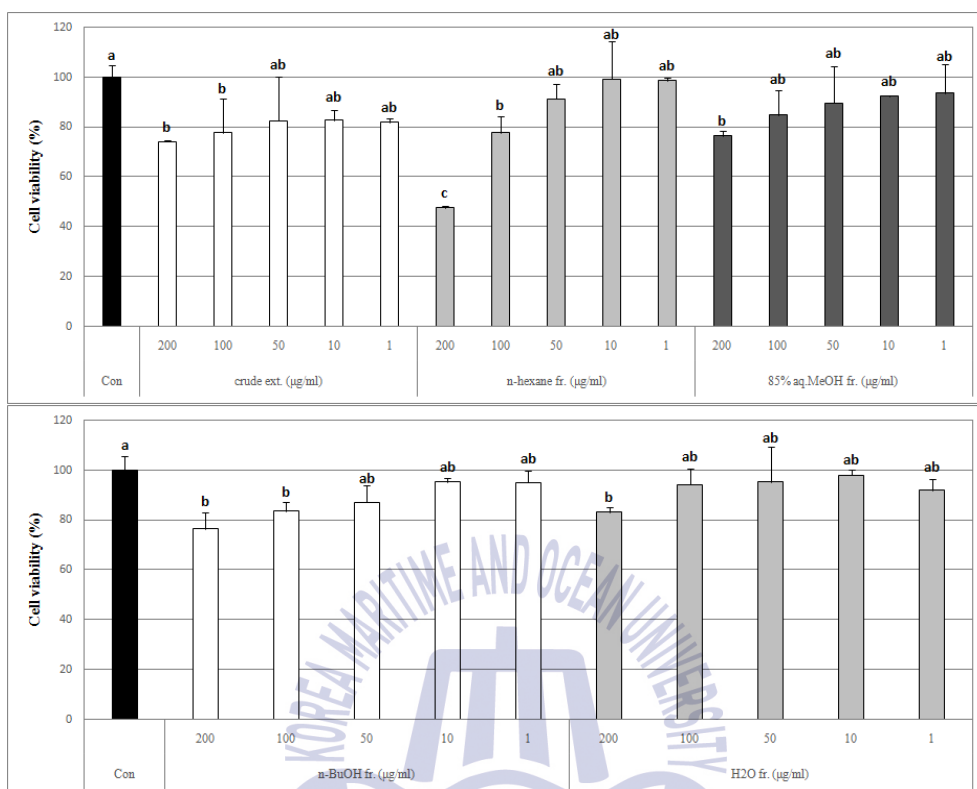


Fig. 12. Effects of crude extract and solvent fractions from *L. japonicum* on viability of HT-1080 cells. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



## (2) Raw 264.7 세포에 대한 조추출물과 용매분획물의 독성 효과

광나무로부터 얻은 조추출물과 용매분획물의 항염증활성을 측정하기 위해 조추출물과 용매분획물이 Raw 264.7 세포생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통하여 확인하였다. 모든 시료의 농도는 200, 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 희석하여 사용하였다. 조추출물의 경우에는 위 농도에서 각각 83.8, 89.4, 88.8, 95.3%의 세포생존율을 보였다. 각 용매 분획물에서는 *n*-hexane 분획물이 66.4, 81.9, 85.3, 87.8%; 85% aq.MeOH 분획물이 75.9, 85.9, 98.8, 98.3%; *n*-BuOH 분획물이 76.4, 80.0, 85.4, 95.4%; 그리고  $\text{H}_2\text{O}$  분획물이 89.8, 90.3, 99.0, 98.1%의 세포생존율을 보였다.

*n*-Hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH 분획물들은 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포 생존을 억제하는 효과를 보였지만, 100  $\mu\text{g/ml}$  이하 농도의 모든 추출물과 분획물에서 80% 이상의 세포 생존율을 보여 세포 성장에 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 세포생존율 측정 결과를 바탕으로 하여 세포내 항염증 활성 실험을 실시하였다.

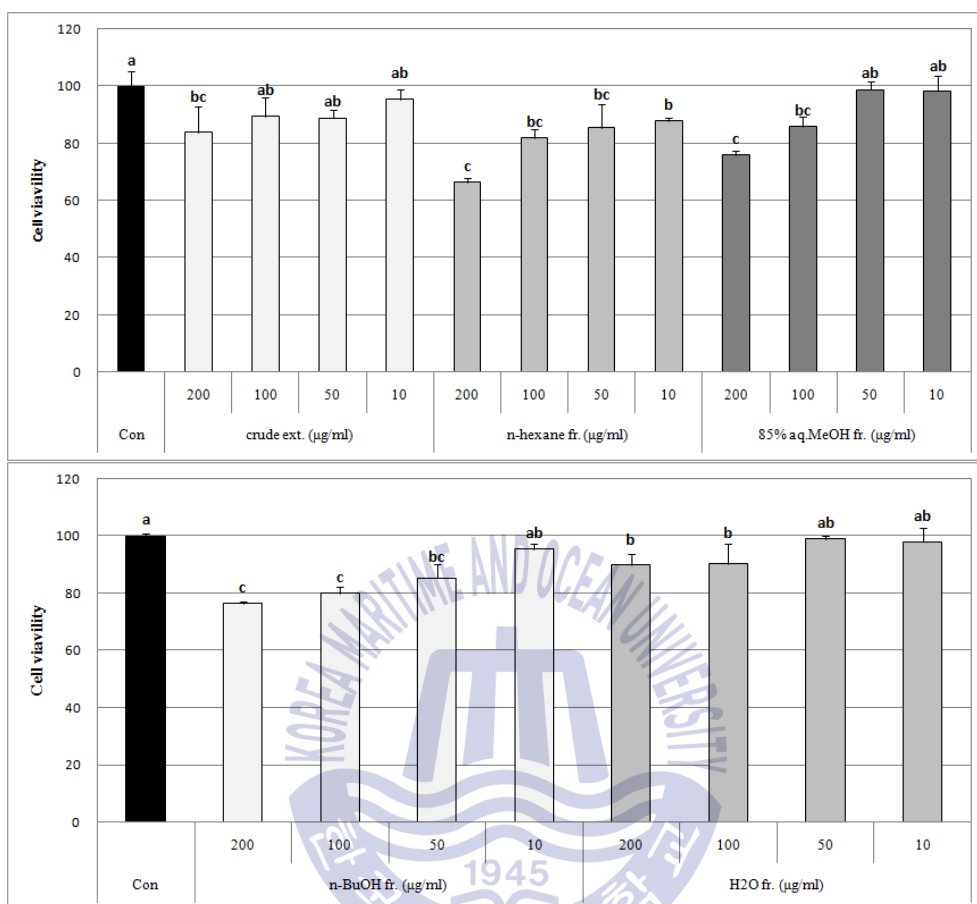


Fig. 13. Effects of crude extract and solvent fractions from *L. japonicum* on viability of Raw 264.7 cells. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### (3) 세포내 활성 산소종(ROS) 소거 활성

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질(DCF)을 만들어내는 DCFH-DA를 사용하여 세포내에 존재하는 활성산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. 조추출물과 각각의 용매분획물은 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 500  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리한 control과 시료와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 모두 처리하지 않은 blank를 실험에 사용하였고, DCF fluorescence 값은 0분부터 120분까지 30분 간격으로 측정하였다. 대조군으로 사용한 control은 시간이 경과함에 따라 급격한 증가를 보였으며, blank는 그 값의 변화가 거의 없었다.

조추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 60분이 지난 후 69.3%의 소거활성을 보였다. *n*-Hexane과 *n*-BuOH의 분획물은 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 60분이 지난 후 약 65.6, 63.9%의 소거 활성을 보였고,  $\text{H}_2\text{O}$  분획물은 52.5%의 낮은 소거 활성을 보였으나 85% aq.MeOH 분획물은 85.8%의 높은 소거 활성을 보였다.

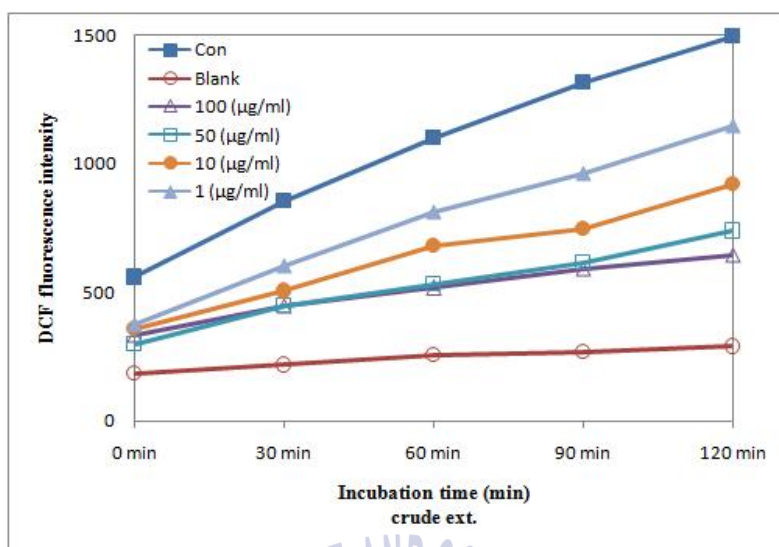


Fig. 14. Effects of crude extract from *L. japonicum* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cells were incubated with different concentration (100, 50, 10, 1 µg/ml) of the sample for the indicated times, respectively.

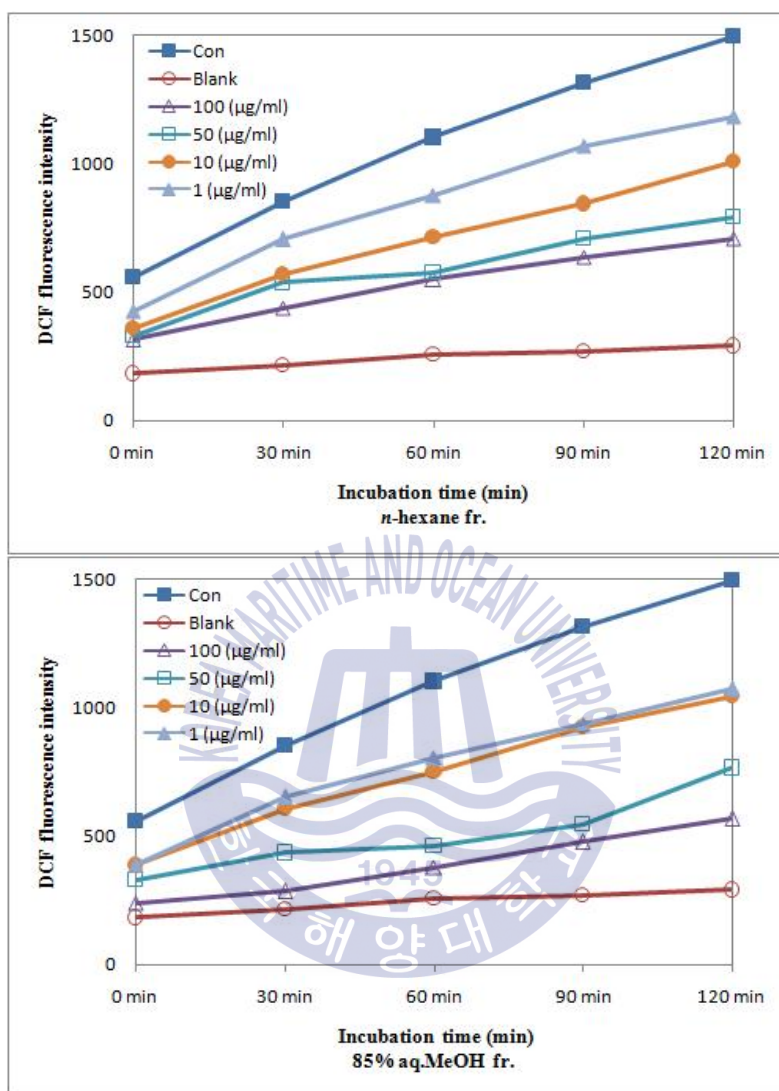


Fig. 15. Effects of *n*-hexane and 85% aq.MeOH fractions from *L. japonicum* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cells were incubated with different concentration (100, 50, 10, 1 µg/ml) of the sample for the indicated times, respectively.

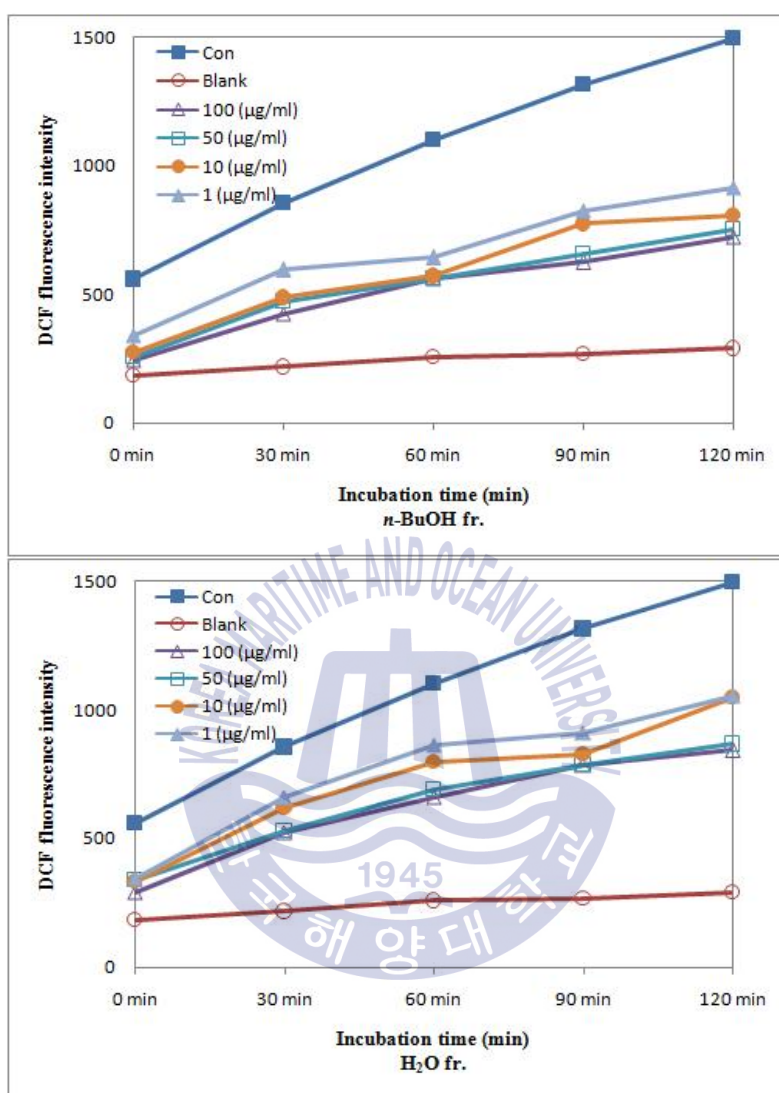


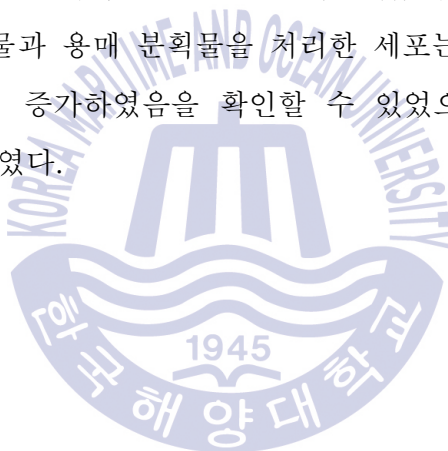
Fig. 16. Effects of *n*-BuOH and H<sub>2</sub>O fractions from *L. japonicum* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cells were incubated with different concentration (100, 50, 10, 1 µg/ml) of the sample for the indicated times, respectively.

#### (4) 세포내 Glutathion (GSH) 함량 측정

세포내 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBBr (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다. 비형광물질인 mBBBr은 세포내 산화생성물을 제거하는 역할을 하는 GSH와 결합하여 형광을 나타내기 때문에, 이를 측정하여 GSH의 함량을 측정하였다.

배양된 HT-1080 세포에 시료를 처리한 후 1시간 뒤, 40  $\mu$ M mBBBr을 처리하여 60분 후 GSH 함량의 변화를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 mBBBr을 처리한 control을 사용하였다.

실험 결과, 조추출물과 용매 분획물을 처리한 세포는 대조군과 비교하여 대부분 GSH 함량이 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 최대 5%가량의 GSH 함량이 증가하였다.



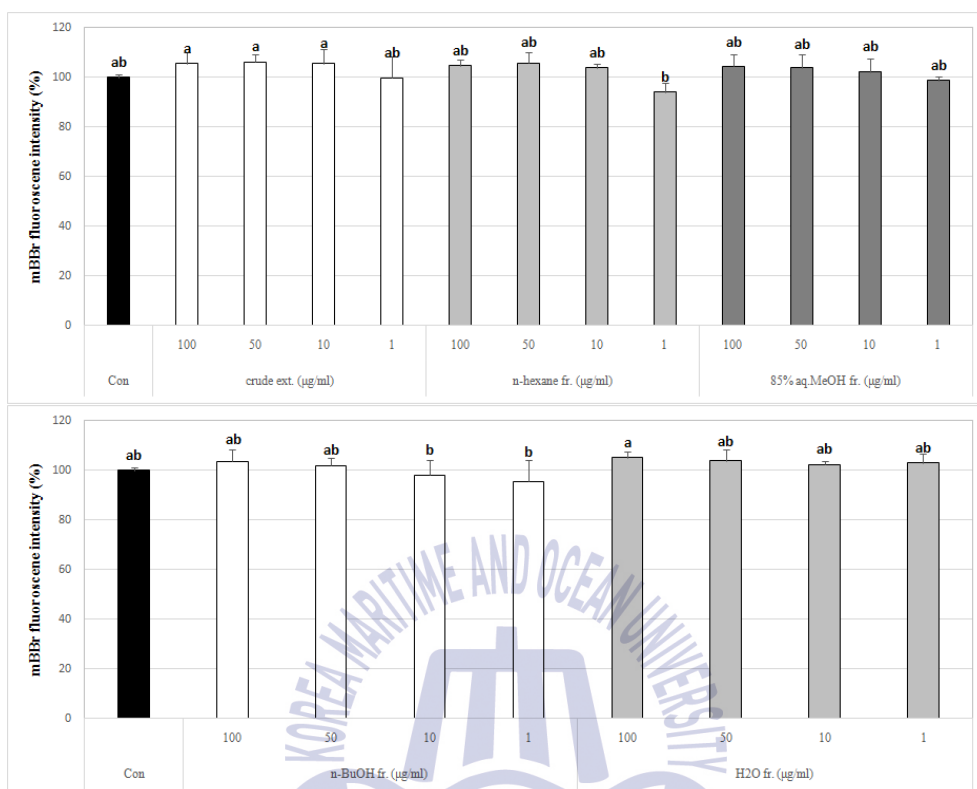


Fig. 17. Effects of crude extract and solvent fractions of *L. japonicum* on regulation of GSH level in HT-1080 cells. <sup>a-b</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



#### (4) Genomic DNA의 산화 생성물 측정

HT-1080 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 각 시료로 처리한 후,  $H_2O_2$ 와  $FeSO_4$ 로 산화시켜 시료가 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 산화시킨 control과 시료와  $H_2O_2$ ,  $FeSO_4$  모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 실험 결과, *n*-BuOH 분획층에서 96.6%로 blank와 비슷한 정도로 DNA 산화를 억제하였고, 조추출물과 *n*-hexane, 85% aq.MeOH  $H_2O$  분획층에서 각각 55.2, 69.0, 69.5, 75.8%의 DNA 산화억제가 나타났다.



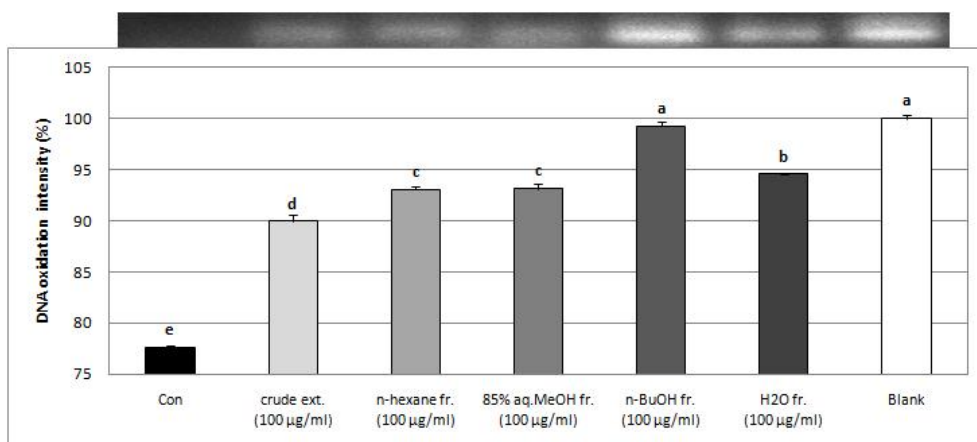
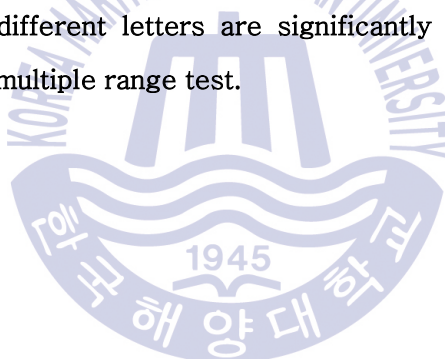


Fig. 18. Antioxidant effect of crude extract and solvent fractions of *L. japonicum* on genomic DNA in HT-1080 cells. <sup>a-e</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



### 3-4. 광나무(*L. japonicum*)의 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 효과

#### (1) HT-1080 세포 증식 억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대하여 추출물 및 분획물의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통하여 측정하였다. 시료는 100, 50, 10 µg/ml의 농도로 24시간 처리하였다. 조추출물로 처리한 세포는 100 µg/ml의 농도에서 약 28.1%의 억제율을 보였고, *n*-Hexane 분획층과 H<sub>2</sub>O 분획층은 45.5, 34.7%의 억제율을 보였지만, 85% aq.MeOH 분획층과 *n*-BuOH 분획층은 각각 65.9, 59.3%의 높은 억제율을 보였다.

#### (2) AGS 세포 증식 억제 효과

인체 위암 세포인 AGS 세포에 대하여 추출물 및 용매분획물의 세포 증식 억제 효과를 MTT assay를 통하여 측정하였다. 조추출물은 100 µg/ml 농도에서 AGS 암세포의 증식을 18.8% 억제하였다. *n*-BuOH 분획층과 H<sub>2</sub>O 분획층은 각각 27.1, 25.7%의 낮은 억제율을 보였으나, *n*-hexane 분획층은 46.3%의 비교적 좋은 억제율을 보였고, 특히 85% aq.MeOH 분획층에서는 76.6%의 높은 억제율을 보였다.

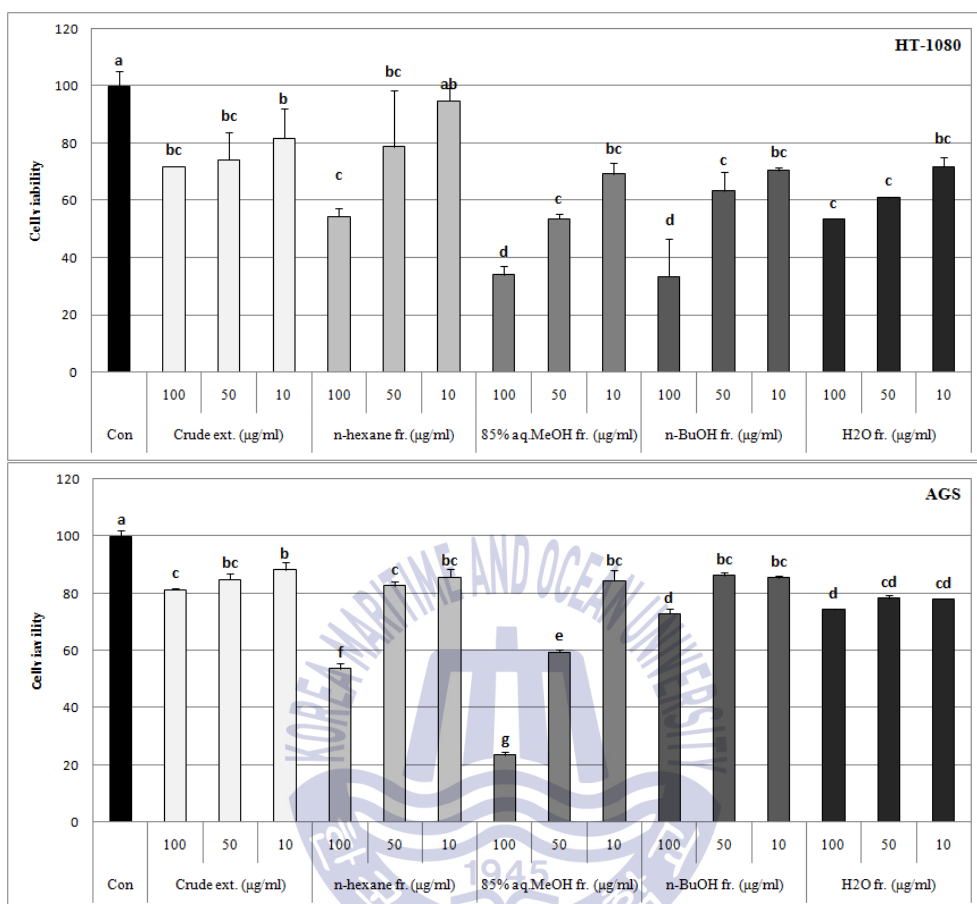


Fig. 19. Effects of crude extract and its solvent fractions from *L. japonicum* on viability of HT-1080 and AGS cells (100, 50, 10 µg/ml). <sup>a-g</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### (3) HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 대장암 세포인 HT-29 세포 증식억제에 대한 추출물 및 용매분획물의 효과를 동일한 방법으로 측정하였다. 조추출물은 100 µg/ml의 농도에서도 18.2%의 낮은 억제율을 보였고, 85% aq.MeOH 분획층과 *n*-BuOH 분획층, H<sub>2</sub>O 분획층 또한 동일한 농도에서 29.1, 23.1, 4.4%의 낮은 억제율을 보였으나 *n*-hexane 분획층은 48.0%로 비교적 높은 억제율을 보였다.

### (4) MCF-7 세포 증식 억제 효과

인체 유방암 세포인 MCF-7 세포의 증식억제에 대하여 조추출물 및 용매 분획물이 미치는 효과를 동일한 방법으로 측정하였다. 조추출물은 100 µg/ml의 농도에서도 18.1%의 낮은 억제율을 보였다. 용매 분획물에서는 85% aq.MeOH 분획물이 46.5%의 비교적 좋은 억제능을 보였으나 *n*-hexane 분획층과 *n*-BuOH 분획층, H<sub>2</sub>O 분획층에서는 27.9, 11.4, 11.1%의 낮은 억제율을 보였다.

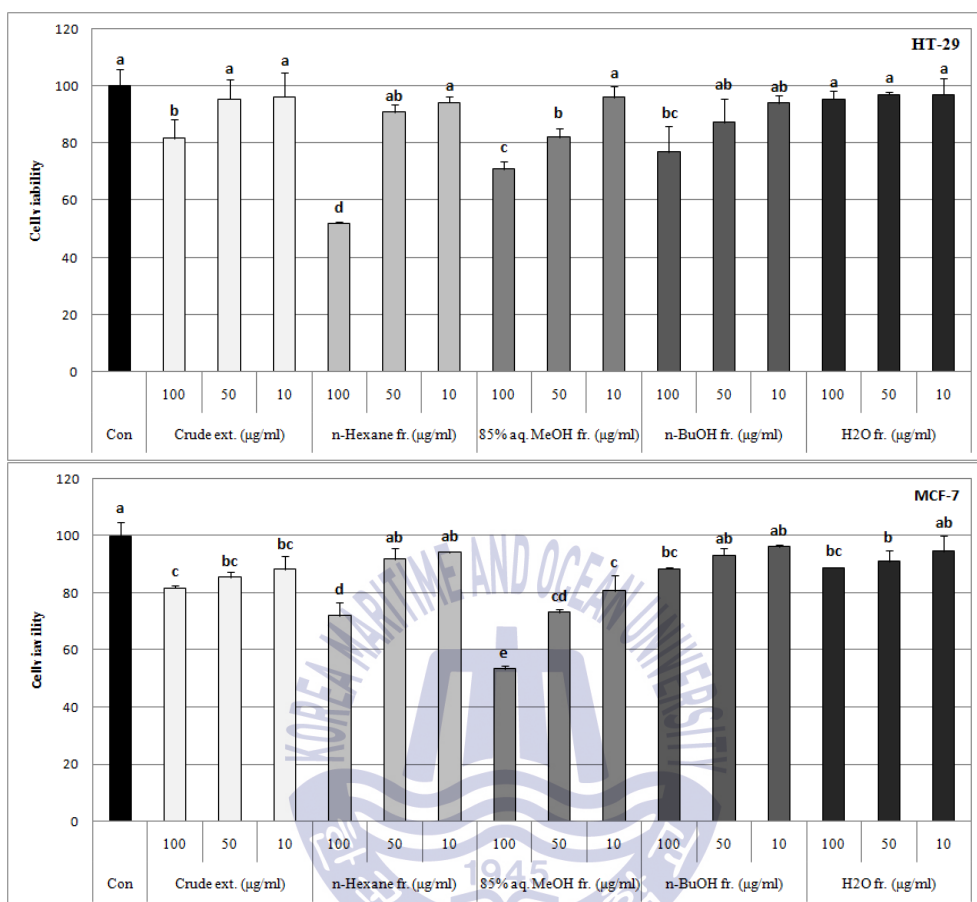


Fig. 20. Effects of crude extract and its solvent fractions from *L. japonicum* on viability of HT-29 and MCF-7 cells (100, 50, 10 µg/ml). <sup>a-e</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3-5. NO 생성 억제 효과

광나무의 항염증 효과를 알아보기 위해 염증 유발 인자인 NO 생성 억제율을 확인하였다. 각 시료의 농도는 100, 50, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였고, 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS를 처리한 control과 시료와 LPS를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

NO 생성을 측정한 결과 Raw 264.7 세포를 LPS로 자극한 control과 비교하였을 때,  $\text{H}_2\text{O}$  분획층을 제외한 모든 시료에서 NO 생성의 억제 효과를 보였으나 그 억제 효과는 크지 않았다.



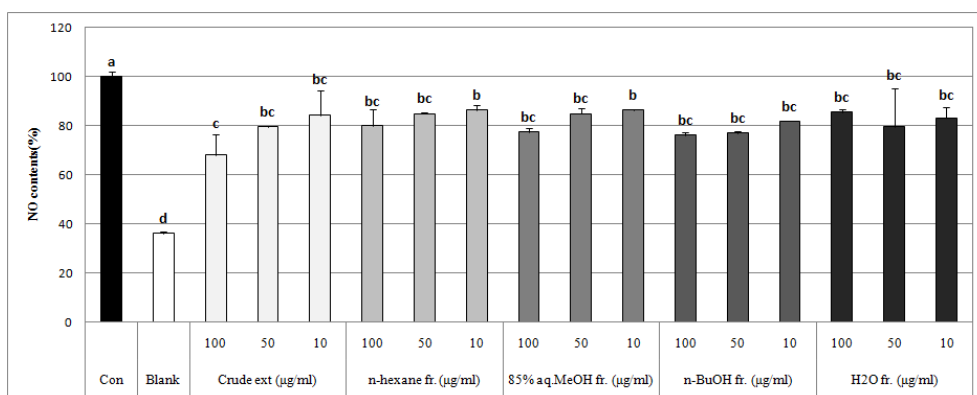
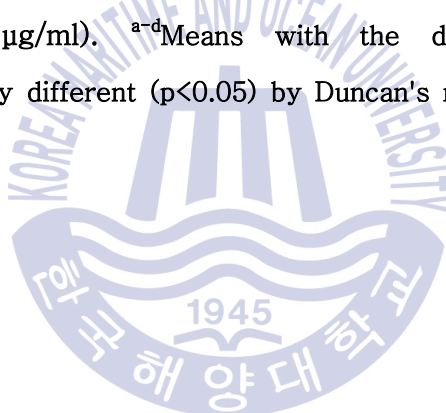


Fig. 21. Effects of crude extract and solvent fractions from *L. japonicum* on nitrite production in Raw 264.7 cells (100, 50, 10 µg/ml). <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.





### 3-6. 광나무에서 분리된 화합물들의 *In vitro* 항산화 활성

#### (1) DPPH radical 소거 활성

광나무로부터 얻어진 화합물들을 각각 100, 50, 10  $\mu$ M의 농도로 희석한 후 DPPH radical 활성을 측정하였다. 대조군으로는 BHA (butylated hydroxyanisole)와 BHT (butylated hydroxy toluene) 그리고 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 시료와 동일한 농도로 희석하여 사용하였다.

측정결과, L-ascorbic acid는 각 농도에서 62.2, 30.2, 15.9%를 BHA는 37.3, 26.3, 13.5%를, BHT는 23.6, 20.8, 11.9%의 소거능을 보였다. compounds 1, 5가 100  $\mu$ M 농도에서 각각 14.9, 14.3%의 소거 활성을 나타내었고, compounds 2, 3, 4, 6 도 100  $\mu$ M 농도에서 각각 13.7, 13.0, 13.0, 13.2%의 소거 활성을 나타내었다.

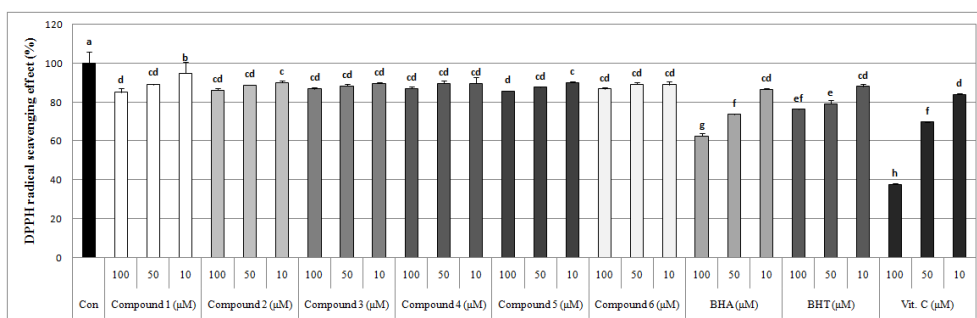


Fig. 22. DPPH radical scavenging activity of compounds 1-6 from *L. japonicum*. <sup>a-h</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



## (2) Peroxynitrite 소거 활성

Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )는 DHR 123과 반응하여 형광성 물질인 rhodamine 123으로 바뀌게 되므로, DHR 123에 authentic  $\text{ONOO}^-$ 와 SIN-1을 처리한 후 그 반응 생성물의 흡광도를 측정함으로써 광나무의 peroxynitrite 소거능을 검토하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid와 penicillamine을 사용하였으며, 각 compounds와 대조군의 농도는 100, 50, 10  $\mu\text{M}$ 로 희석하여 사용하였다.

Authentic  $\text{ONOO}^-$  소거활성검색에서는 compound 6가 100  $\mu\text{M}$  농도에서 99.4%의 소거 활성을 나타내었고, compounds 1, 2, 4, 5 도 100  $\mu\text{M}$  농도에서 각각 63.5, 83.2, 69.9, 83.3% 이상의 소거 활성을 나타내었다. SIN-1에서 유도된  $\text{ONOO}^-$  소거활성검색에서는 compound 6이 10  $\mu\text{M}$  농도에서 92.6%의 소거 활성을 나타내었고, compounds 1, 3 도 10  $\mu\text{M}$  농도에서 58.1, 61.4%의 소거활성을 나타내었다.

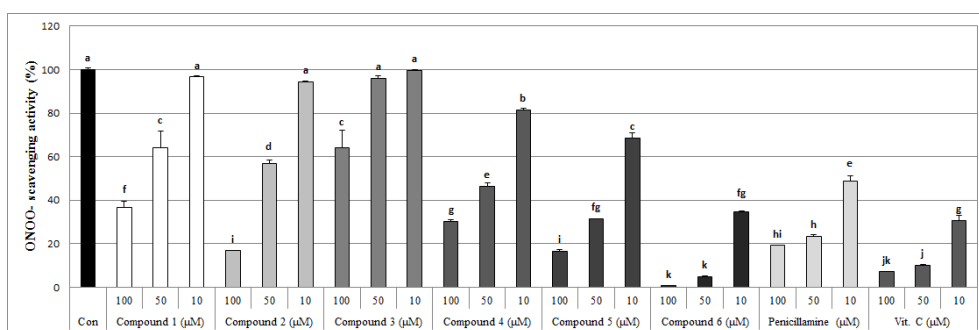


Fig. 23. Scavenging effects of compounds 1-6 from *L. japonicum* on authentic  $\text{ONOO}^-$  (% of control). <sup>a-k</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



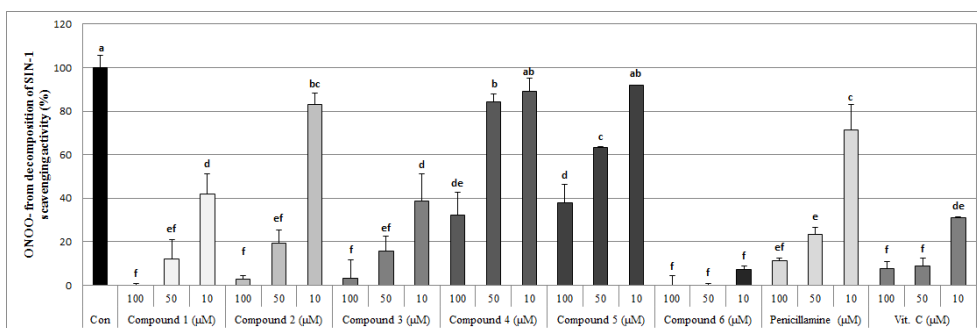


Fig. 24. Scavenging effects of compounds 1-6 from *L. japonicum* on  $\text{ONOO}^-$  from SIN-1 (% of control). <sup>a-f</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



### 3-7. 광나무에서 분리된 화합물들의 세포내 항산화 활성

#### (1) HT-1080 세포생존율 측정

광나무로부터 분리된 compounds의 항산화 활성을 측정하기 위해 compounds가 HT-1080 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통하여 확인하였다. 모든 시료의 농도는 100, 50, 10, 1  $\mu$ M로 희석하여 사용하였다. 모든 compounds가 100  $\mu$ M 농도에서 세포 생존을 억제하는 효과를 보였지만, 50  $\mu$ M 농도 이하에서 80% 이상의 세포 생존율을 보여 세포 성장에 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. MTT assay를 이용한 세포생존율 측정 결과를 바탕으로 하여 세포내 항산화 활성 실험을 실시하였다.



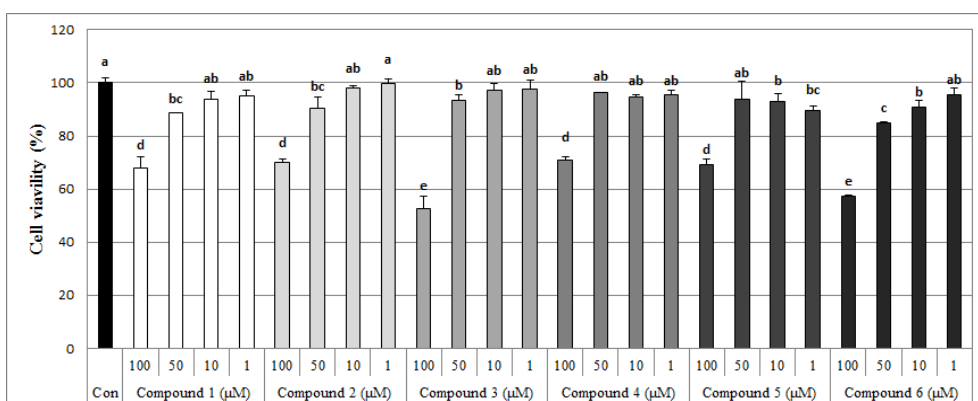
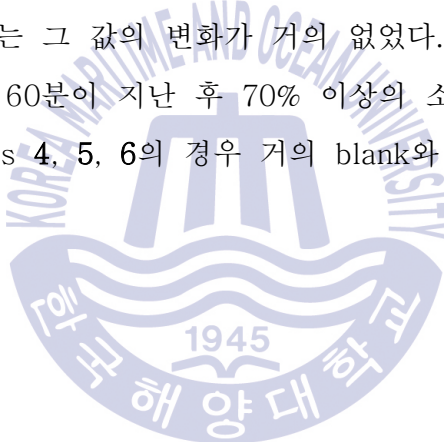


Fig. 25. Effects of compounds 1-6 from *L. japonicum* on viability of HT-1080 cells. <sup>a-e</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



## (2) 세포내 활성 산소종(ROS) 소거 활성

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질(DCF)을 만들어내는 DCFH-DA를 사용하여 세포 내에 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. 각 compounds는 50, 10, 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 500  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리한 control과 시료와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 모두 처리하지 않은 blank를 실험에 사용하였고, DCF fluorescence 값은 0분부터 120분까지 30분 간격으로 측정하였다. 대조군으로 사용한 control은 시간이 경과함에 따라 급격한 증가를 보였으며, blank는 그 값의 변화가 거의 없었다. 모든 compounds는 50  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 60분이 지난 후 70% 이상의 소거 활성을 나타내었고, 특히 compounds 4, 5, 6의 경우 거의 blank와 흡사할 정도의 소거 활성을 나타내었다.





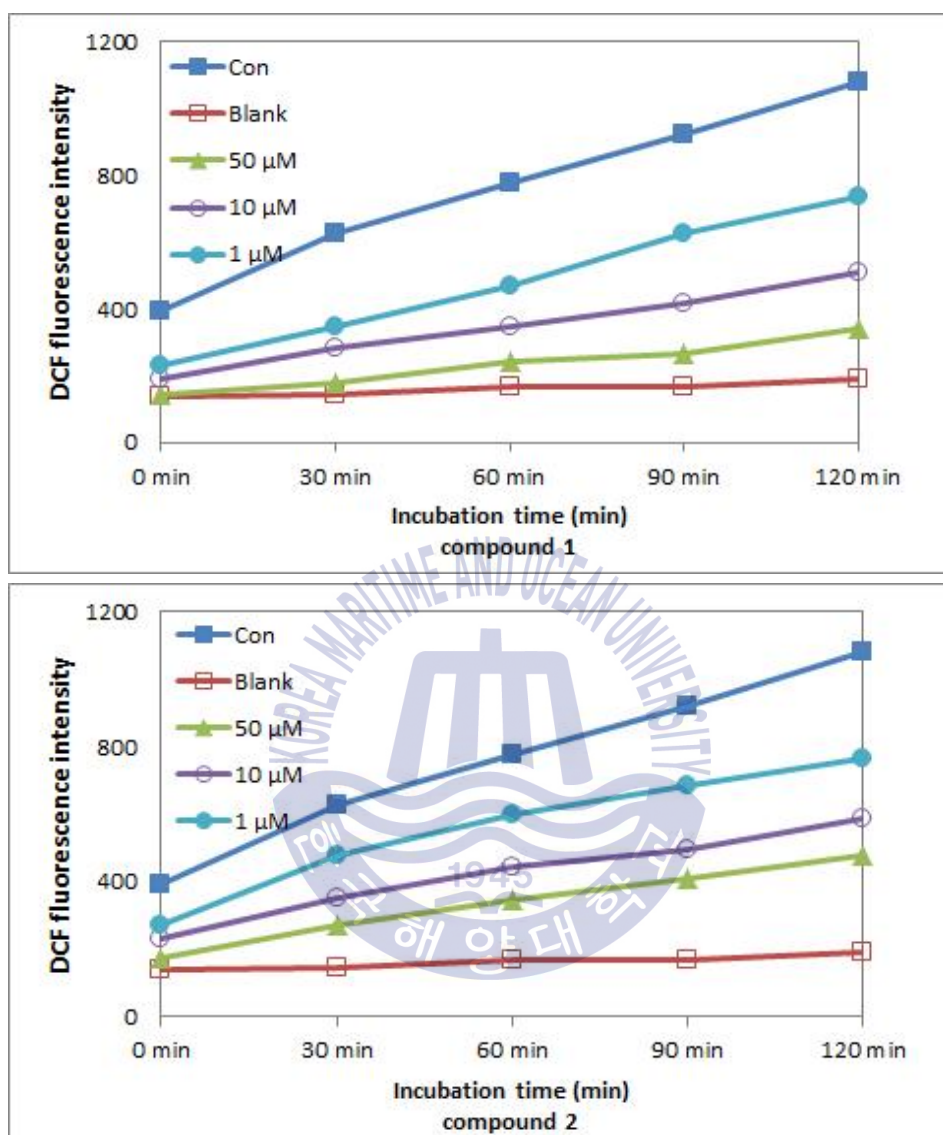


Fig. 26. Effects of compounds 1-2 from *L. japonicum* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cells were incubated with different concentration (50, 10, 1  $\mu\text{M}$ ) of the sample for the indicated times, respectively.

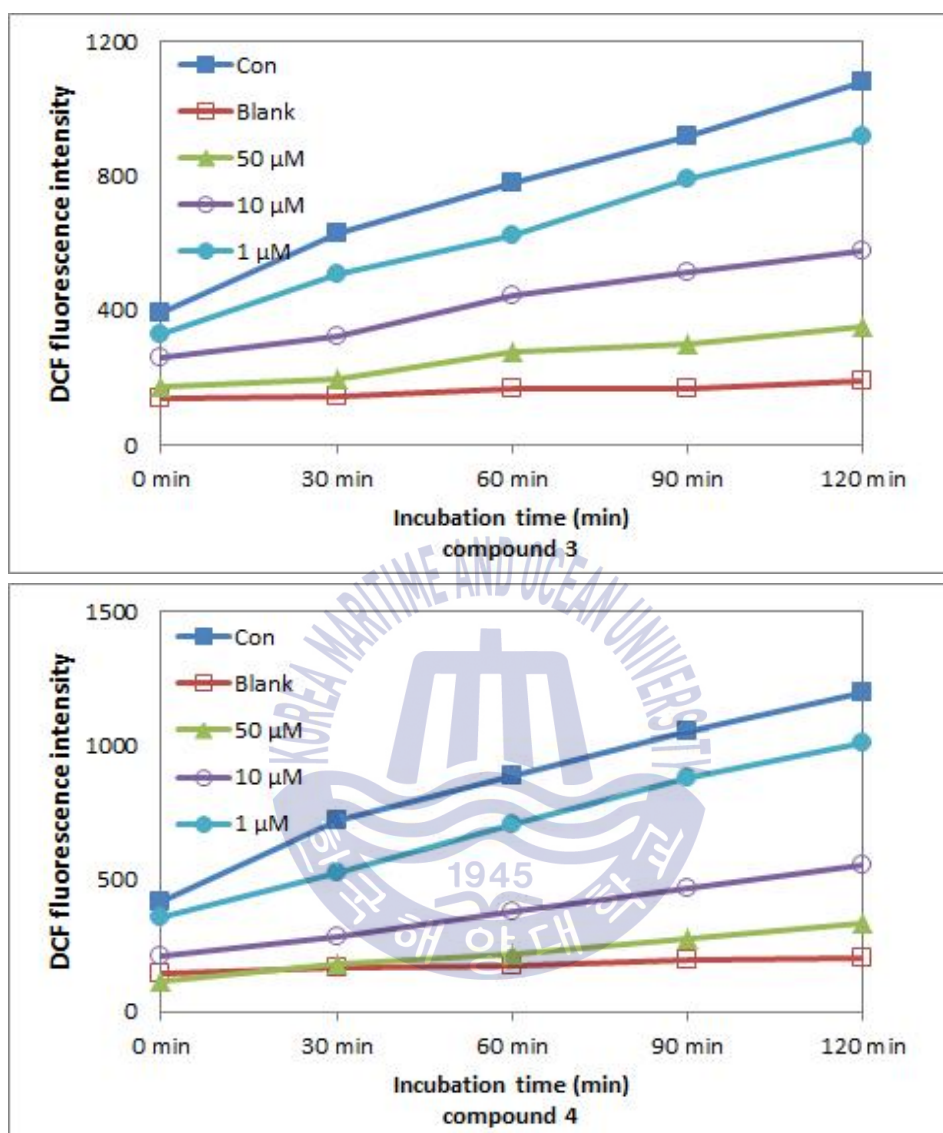


Fig. 27. Effects of compounds 3-4 from *L. japonicum* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cells were incubated with different concentration (50, 10, 1  $\mu$ M) of the sample for the indicated times, respectively.

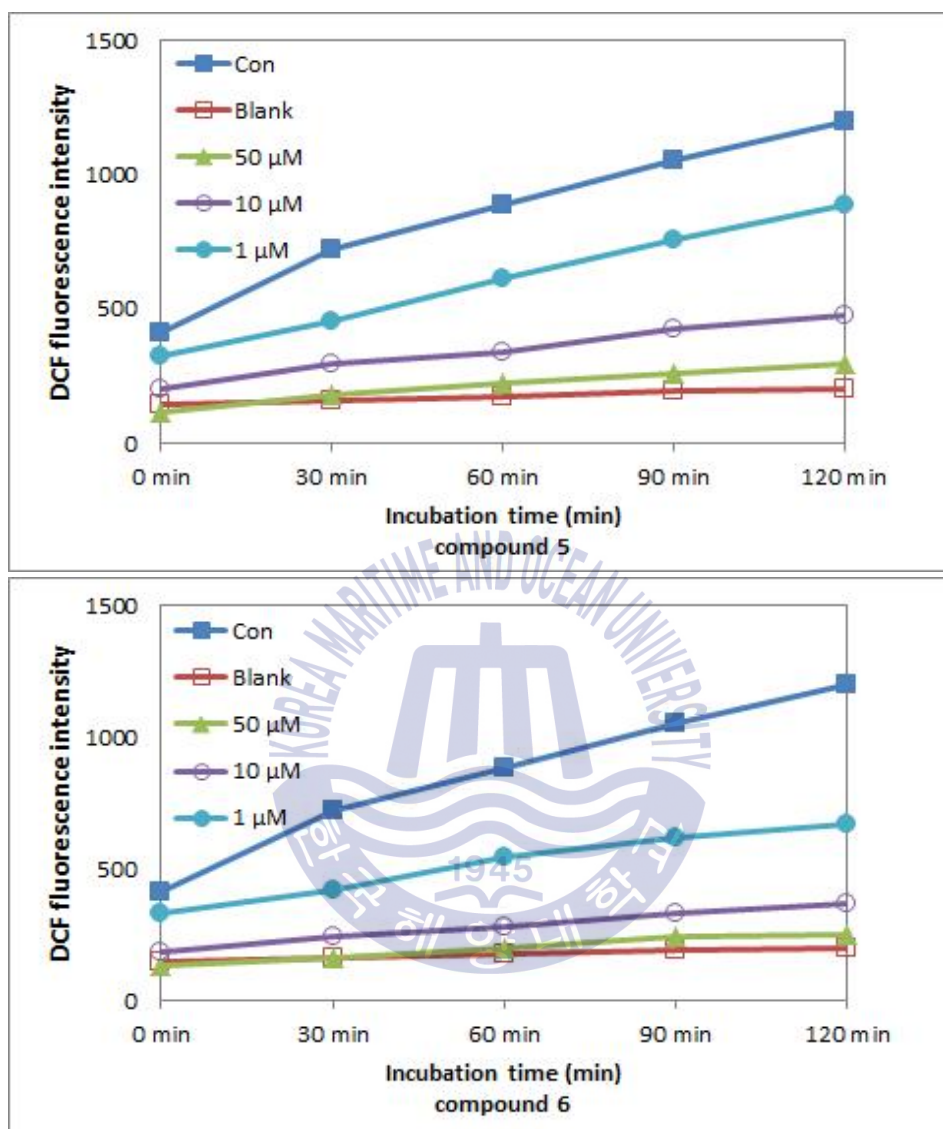


Fig. 28. Effects of compounds 5-6 from *L. japonicum* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cells were incubated with different concentration (50, 10, 1  $\mu$ M) of the sample for the indicated times, respectively.

### (3) 세포내 glutathione (GSH) 함량 측정

세포내 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBBr (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다. 비형광물질인 mBBBr은 세포 내 산화생성물을 제거하는 역할을 하는 GSH와 결합하여 형광을 나타내기 때문에, 이를 측정하여 GSH의 함량을 측정하였다. 배양된 HT-1080 세포에 50, 10, 1  $\mu\text{M}$  농도의 시료를 처리한 후 1시간 뒤, 40  $\mu\text{M}$  mBBBr을 처리하여 60분 후 GSH 함량의 변화를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 mBBBr을 처리한 control을 사용하였다. 실험 결과, compound 6를 제외한 모든 compounds에서 농도 의존적인 소량의 GSH 함량 증가가 나타났다.



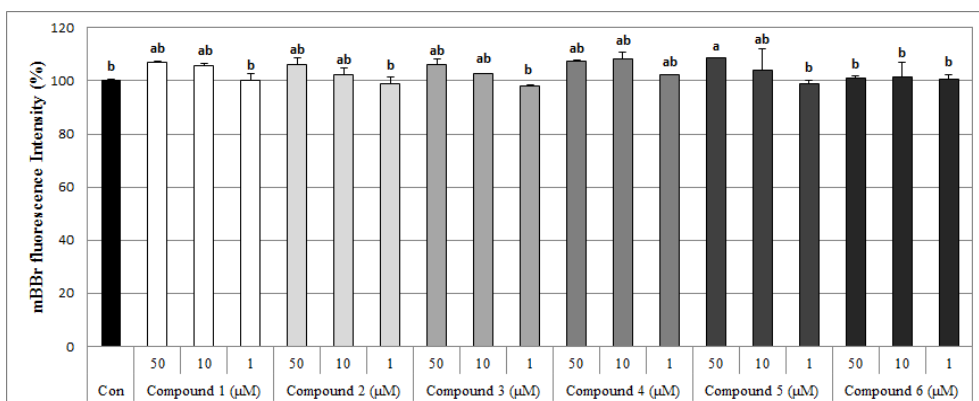


Fig. 29. Effects of compounds 1–6 of *L. japonicum* on regulation of GSH level in HT-1080 cells. <sup>a-b</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



#### (4) Genomic DNA의 산화 생성물 측정

HT-1080 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 각 시료를 처리한 후,  $H_2O_2$ 와  $FeSO_4$ 로 산화시켜 시료가 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 산화시킨 control과 시료와  $H_2O_2$ ,  $FeSO_4$  모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 실험 결과, compounds 1-6은 blank와 비교 시 각각 31.7, 37.1, 44.7, 28.6, 45.9, 62.1%의 DNA 산화 억제 효과를 보였다.



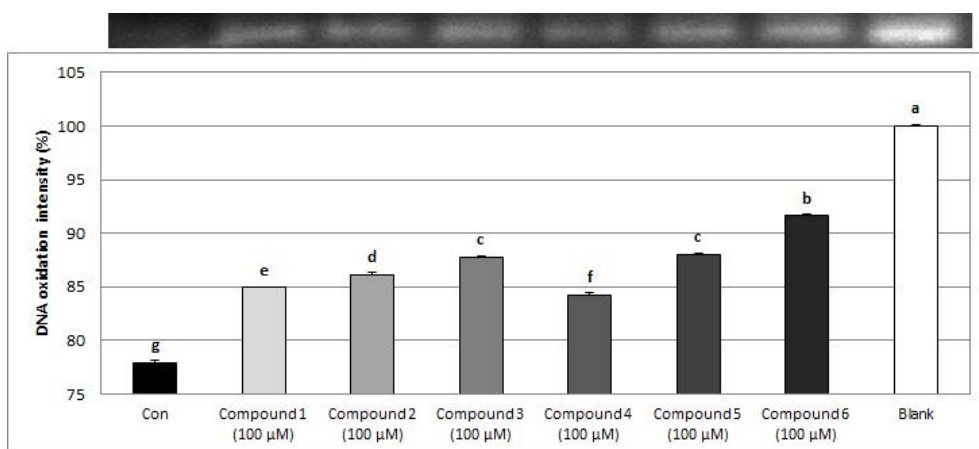
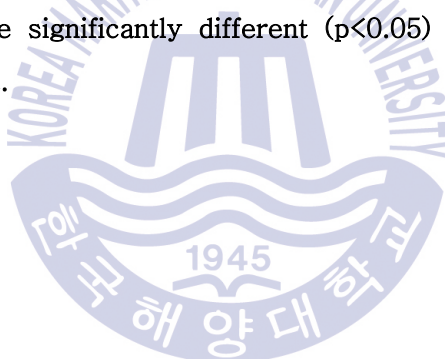


Fig. 30. Antioxidant effect of compounds 1–6 of *L. japonicum* on genomic DNA in HT-1080 cells. <sup>a–g</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



### 3-8. compounds의 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 효과

#### (1) HT-1080 세포 증식 억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대하여 조추출물 및 분획물의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통하여 측정하였다. 시료는 50, 10, 1  $\mu$ M의 농도로 처리하였다. 50  $\mu$ M의 농도에서 compound 3은 84.5%의 세포성장 억제 효과를 보였고, compounds 1, 2, 5는 각각 47.3, 42.9, 43.5%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 같은 농도에서 compounds 4, 6은 각각 11.8, 20.8%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다.

#### (2) AGS 세포 증식 억제 효과

인체 위암 세포인 AGS 세포에 대하여 조추출물 및 분획물의 세포 증식 억제 효과를 MTT assay를 통하여 동일한 방법으로 측정하였다. 50  $\mu$ M의 농도에서 compound 3은 AGS 세포에 대하여 94.2%의 세포성장 억제 효과를 보였고, compounds 1, 2, 5는 각각 51.4, 62.2, 48.1%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 같은 농도에서 compounds 4, 6은 각각 23.4, 36.4%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다.



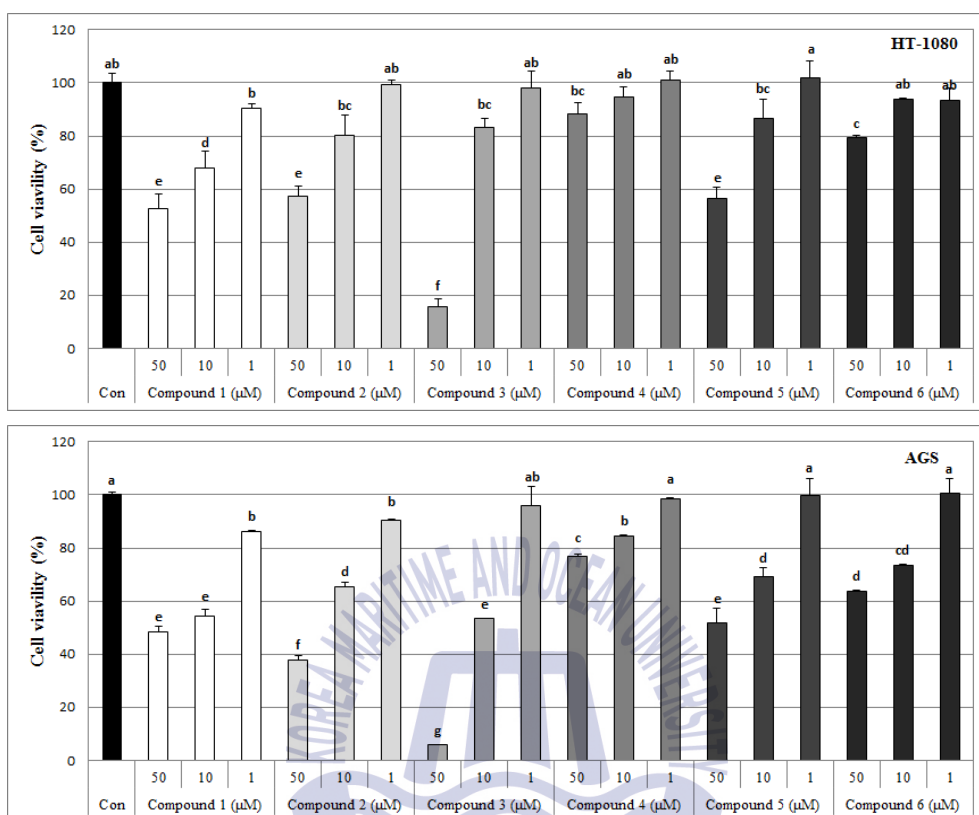


Fig. 31. Effects of compounds 1-6 from *L. japonicum* on viability of HT-1080 and AGS cells (50, 10, 1 μM). <sup>a-g</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### (3) HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 대장암 세포인 HT-29 세포 증식에 대한 추출물 및 분획물의 영향을 동일한 방법으로 측정하였다. 50  $\mu$ M의 농도에서 compound 3은 45.2%의 세포성장 억제 효과를 보였고, compounds 1, 2는 각각 30.0, 31.3%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 같은 농도에서 compounds 4, 5, 6은 각각 22.4, 25.7, 24.9%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다.

### (4) MCF-7 세포 증식 억제 효과

인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에 대하여 조추출물 및 용매 분획물이 미치는 영향을 동일한 방법으로 측정하였다. 50  $\mu$ M의 농도에서 compound 3은 69.7%의 세포성장 억제 효과를 보였고, compounds 1, 2는 각각 40.3, 34.8%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 같은 농도에서 compounds 4, 5, 6은 각각 20.5, 24.4, 23.5%의 세포 성장 억제 효과를 나타내었다.

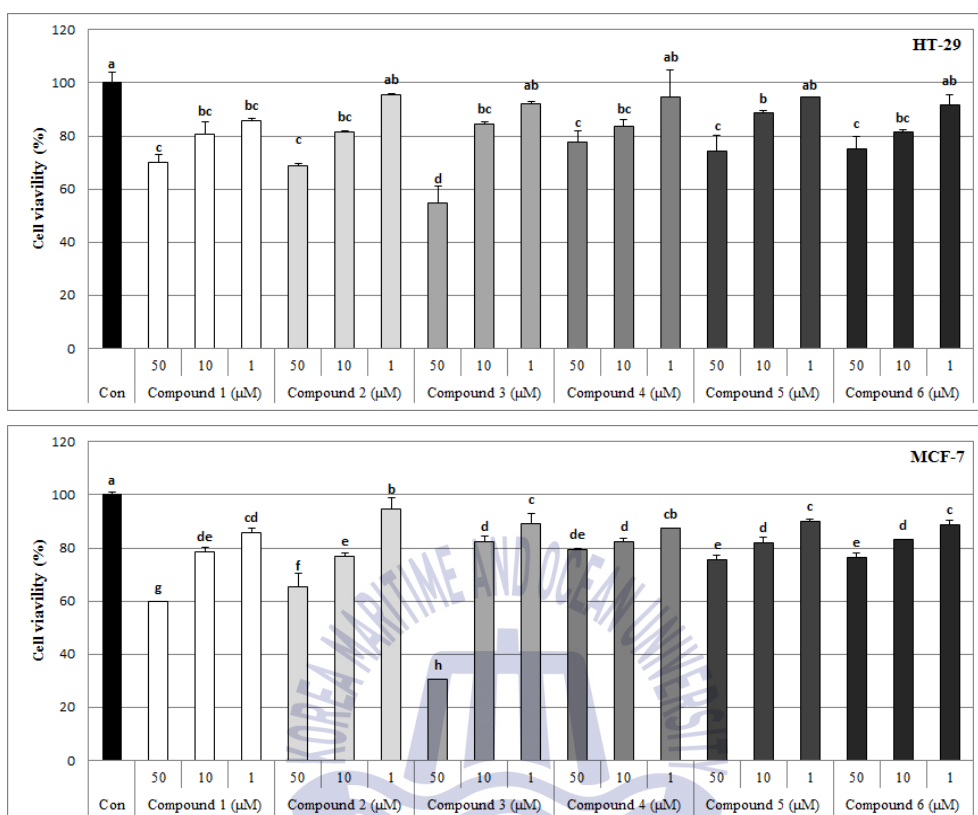


Fig. 32. Effects of compounds 1-6 from *L. japonicum* on viability of HT-29 and MCF-7 cells (50, 10, 1  $\mu$ M). <sup>a-h</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 4. 요약 및 결론

시대가 지남에 따라 인류의 생활양식이 변화하고 이에 따라 기존의 알고 있던 질병 외에 새로운 질병들이 생겨나고, 암과 같이 아직 완전한 치료법을 찾지 못한 질병들 또한 갈수록 늘어나고 있다. 이러한 질병들을 극복하기 위해 인류는 오래전부터 자연에 존재하는 동·식물에 관심을 가져 왔으며 특히 동·식물에 존재하는 화학성분을 순수하게 분리하여 인간에게 유용한 의약품을 개발함으로써 이러한 질병을 극복하고자 하였다. 우리나라의 남해 지역의 바닷가나 섬지방의 산기슭에 자생하는 광나무는 염분을 가장 많이 함유한 나무중 하나로서 한방에서는 간과 심장을 강화하고 이명, 현기증, 냉증의 치료에 사용되어 왔다. 본 연구에서는 이러한 광나무를 대상으로 생리 활성 효과와 그 화학적 성분을 분리해 봄으로써 생리 활성 물질 개발에 대한 가능성을 탐색하고자 하였다.

광나무를 methylene chloride로 추출하고, 그 잔사를 MeOH로 다시 추출하여 조추출물을 얻었으며, 이를 유기용매의 극성도에 따라 분획하여 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 순차적으로 얻었다. 각 조추출물과 용매 분획물의 항산화 활성을 검색하기 위해 DPPH radical 소거능과 peroxynitrite 소거능을 측정한 결과, *n*-BuOH 분획층이 비교적 좋은 DPPH radical 소거능을 보여 주었으며, peroxynitrite 소거능은 85% aq.MeOH 분획층과 *n*-BuOH 분획층에서 좋은 효과를 나타내었다. SIN-1으로부터 유도된 peroxynitrite에 대해서는 *n*-hexane 분획층을 제외한 모든 분획층에서 좋은 활성을 보여주었다.

HT-1080 세포내에서 생성되는 활성 산소종(ROS)에 대한 소거 효능을 검색한 결과, 추출물을 포함하여 모든 용매 분획물이 유의적인 ROS 소거 활성을 나타내었다. 그중에서 85% aq.MeOH 분획물이 가장 높은 ROS

소거 활성을 보였으며 *n*-hexane 분획층과 *n*-BuOH 분획층에서도 높은 ROS 소거활성을 나타내었다. HT-1080 세포내에서 항산화 물질인 GSH의 함량에 미치는 광나무 시료의 효과를 측정한 결과, 모든 시료가 GSH 증가에 영향을 미쳤으나 그 영향은 매우 작았다.

광나무 시료가 암세포 증식억제에 미치는 효과를 탐색하기 위하여 인체 유래 암세포인 HT-1080, AGS, HT-29, MCF-7에 대한 성장억제 효과를 측정하였다. 모든 암세포들에서 85% aq.MeOH 분획층이 높은 암세포 증식억제 효과를 나타내었다. *n*-Hexane 분획층은 HT-29에서 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었고, *n*-BuOH 분획층은 HT-1080에서 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다.

항염증에 대해 광나무 시료가 미치는 영향을 알아보기 위해 NO의 생성 억제 효과를 측정하였고, Raw 264.7 세포에 LPS로 자극한 control과 비교하였을 때 H<sub>2</sub>O 분획층을 제외한 모든 시료에서 NO 생성의 억제 효과를 보였으나 그 억제 효과는 크지 않았다.

각각의 용매분획물에 NMR 분광분석 및 전체적인 생리활성결과를 고려하여 결과가 우수한 85% aq.MeOH 분획층과 *n*-BuOH 분획층에서 활성물질 분리를 시작하였다. 그리하여 이 두 용매분획물로부터 모두 6개의 화합물 (1-6)을 분리하였으며 이렇게 분리된 화합물들에 대해서도 기본적인 생리활성을 검색하였다. Peroxynitrite 소거활성 검색에서는 compound 6이 10  $\mu$ M의 농도에서도 authentic peroxynitrite와 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite에 대해 각각 65.2, 92.6%의 소거 효과를 나타내었다. 또한 같은 농도에서 compounds 1과 3이 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite에 대해 각각 58.1, 61.4%의 소거 효과를 보였다. 또한 세포내 활성산소종(ROS) 소거활성 검색에서 compounds 1-6 모두 50  $\mu$ M의 농도에서 60분이 지난 후 각각 70% 이상의 소거활성을 보였고, 특히 compounds 4, 5, 6은

blank와 비슷할 정도의 소거 활성을 보였다.

인체 유래 암세포를 이용한 MTT assay에서는 모든 암세포에 대해 compound 3이 효과적인 암세포 증식 억제 효과를 나타내었으며, compounds 1, 2, 5 또한 HT-1080, AGS 세포에 대해 효과적인 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 이와 같은 활성결과에 근거해서 triterpenoids(1-3)는 좋은 항암효과를 보이고 secoiridoids(5-6)는 좋은 항산화 효과를 보이는 것으로 여겨진다. 또한 85% aq.MeOH 용매분획층과 n-BuOH 분획층의 C<sub>18</sub> 크로마토그래피 분획의 NMR 데이터를 분석해 보면 두 분획층 모두 triterpenoids와 secoiridoids 유도체들을 포함하고 있었다. 따라서 n-BuOH 분획층과 85% aq.MeOH 분획층의 활성차이는 이러한 유도체들을 상대적으로 얼마 만큼 함유하고 있느냐에 달려 있는 것처럼 보인다.

Compounds 1-3의 항암활성과 4-5의 항산화 활성은 이미 문헌에 보고된 바 있다(Li J., *et al* 2002; Fernando J. R. Z., *et al* 2003; Shao J. W., *et al* 2011; Covas M., *et al*, 2003; İlhami G., *et al*, 2009).

결론적으로 이상과 같은 실험결과는 광나무가 항산화, 항암 등의 소재로서 활용가능성이 높음을 보여 주며 앞으로 추가적인 연구를 통하여 항산화, 항암 등의 효과를 가진 비슷한 구조의 화합물 분리가 기대되어진다.

## 5. 참고문헌

- 조정옥, 정인창. 광나무 잎의 페놀성 화합물, *한국식품영양과학회지*, **35(6)**, 713-720(2006)
- 김은규, 한국의 염생식물, *자연과 생태*, (2013)
- 동의학사전편찬위원회, 신 동의학사전, *여강출판사*, (2003)
- Amzad Hossain M., Ismail Z. Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineus*, *Arabian Journal of Chemistry*, **6(3)**, 295-298(2013)
- Andres G. G., Antonio M., Juan N. M., Andres P., Francisco R. 2-a, 3-b-Dihydroxyolean-12-en-28-oic Acid (Maslinic Acid), *Molecules*, **3(7)**, 88(1998)
- Andre's G. G., Pilar E. L., Enrique M., Andre P., Yolanda S. Partial synthesis of C-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Formation of several triene systems by chemical and photochemical isomerization processes, *Tetrahedron*, **60(7)**, 1491-1503(2004)
- Beckman K. B., Ames B. N. The free radical theory of aging matures, *Physiol Rev*, **78**, 547-581(1998)
- Beda, N., Nedospasov A. A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric oxide*. **13**, 93-97(2005)
- Bednarczyk C. B., Zaprutko L., Ruszkowski P., Hładoń B. Anticancer effect of A-ring or/and C-ring modified oleanolic acid derivatives on KB, MCF-7 and HeLa cell lines. *Org Biomol Chem*, **10(11)**, 201-2205(2012)
- Bianca B., Marlene L., Kathrin W., Huppertz H., Anne-Sophie W.,

- Astrid W., Rolf J., Thomas J. F. Reactive oxygen species (ROS) in the human neocortex: Role of aging and cognition, *Brain Research Bulletin*, **81(4-5)**, 484-490(2010)
- Blois M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **25**, 1199-1200(1958)
- Butterfield D. A. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain, *Free Radic Res*, **36** 1307-1313(2002)
- Covas M., Miró-Casas E., Fitó M., Farré-Albadalejo M., Gimeno E., Marrugat J., De L. T. R. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs Exp Clin Res*, **29(5-6)**:203-206(2003)
- Fernando J. R. Z., Gisela P. P., Daneida L., Eva E. R. P., Marta C., José A. L. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism, *Cancer Lett*, **273(1)**, 44-54(2009)
- Fukuyama Y., Koshino K., Hasegawa T., Yamada T., Nakagawa K. New Secoiridoid Glucosides from *Ligustrum japonicum*, *Planta Med*, **53(5)**, 427-431(1987)
- Gao B. B., She G. M., She D. M. Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Ligustrum*, *Pharmaceutical & Medicinal Chemistry*, **10(1)**, 96-128(2013)
- Ghias U., Waliullah, Bina S. S., Muhammad A., Anwar S., Ashfaq A., Ala U. Chemical Constituents and Phytotoxicity of Solvent Extracted Fractions of Stem Bark of *Grewia optiva* Drummond



- ex Burret, *Middle-East Journal of Scientific Research*, **8(1)**, 85-91(2011)
- Gulam W., Haseeb A. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions, *J Carcinog*, **5(1)**, 14(2006)
- He Z. D., Dong H., Xu H. X., Ye W. C., Sun H. D., But P. P. H. Secoiridoid constituents from the fruits of *Ligustrum lucidum*, *Phytochemistry*, **56(4)**, 327-330(2001)
- Ibrahim T. B., Francis O. S. Ubiquitous Ursolic Acid: A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2(2)**, 214-222(2013)
- İlhami G., Riad E., Akçahan G., Khalil T., Ekrem K. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.), *Wood Science and Technology*, **43(3-4)**, 195-212(2009)
- Jayakumar B., Ana R. M., Sergey S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance, *journal of Experimental Botany*, **65(5)** 1241-1257(2014)
- John P. Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination, *Molecular and Cellular Endocrinology*, **299(5)**, 89-100(2009)
- Júlio C. A. T., Gentil J. V., Cleuza C. D. S. A New Tormentic Acid Derivative from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae), *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14(3)**, 475-478(2003)
- Karim C., Faycal H., Asma N., Majda D. R., Nicolas E., David T., Hichem B. J., M'hamed A. H. Semi-synthesis of new

- antimicrobial esters from the natural oleanolic and maslinic acids, *Food Chemistry*, **183**, 8-17(2015)
- Kefu Z., Jie S., Gu F., Meng Z. Species, types, distribution, and economic potential of halophytes in China. *Plant and Soil*, **342** 495-509(2010)
- Kenichiro I., Toshio N., Takao T., Hiroyuki I. Three secoiridoid glucosides from *Ligustrum japonicum*, *Phytochemistry*, **21(9)**, 2305-2311(1982)
- Kong C. S., Um Y. R., Lee J. I., Kim Y. A. Lee J. S. and Seo Y. W. Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on groth of human cancer cells. *Korean J. Niotechnol. Bioeng.*, **23(2)**, 177-182(2008)
- Kooy N. W., Royall J. A., Ischiropoulos H., Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine*, **16**, 149-156(1994)
- Kuwajima H., Matsuuchi K., Takaishi K., Inoue K., Fujita T., Inouye H. A secoiridoid glucoside from *Ligustrum japonicum*. *Phytochemistry*, **28(5)**, 1409-1411(1989)
- Lance B. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology, *Cardiovascular Research*, **61(3)**, 15(2004)
- Lee T. H., Juang S. H., Hsu F. L., Wu C. Y. Triterpene Acids from the Leaves of *Planchonella duclitan* (Blanco) Bakhuizen, *Journal of the Chinese Chemical Society*, **52(6)**, 1275-1280(2005)

- Li J., Guo W. J., Yang Q. Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15, *World J Gastroenterol*, **8(3)**, 493-495(2002)
- Mügge A. The role of reactive oxygen species in atherosclerosis, *Z Kardiol*, **87(11)**, 851-64(1998)
- Oswaldo G. L., Angel T., Francisco J. F., Mari'a d. J. Y. M., Gerardo S. C. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*, *World J Microbiol Biotechnol*, **23**, 1473-1477(2007)
- Vassiliki T. P., Kyriaki P., Eleftheria P., Nikolaos N., Vassilios J. D., Maria Z. T. Antioxidant and aldose reductase inhibition activity of *Ligustrum japonicum* and *Olea europaea* L. leaf extracts, *European journal of lipid science and technology : EJLST*, **113(7)**, 876-885(2011)
- Roxani A., Giagkos L., Panagiota M. ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology, *Reproductive Toxicology*, **28(2)**, 167-171(2009)
- Shao J. W., Dai Y. C., Xue J., Wang J. C., Lin F. P., Guo Y. H. In vitro and in vivo anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46(7)**, 2652-2661(2011)
- Shin H. J., Shin M. O. Antimicrobial- and Anticarcinogenic Activities of *Amphitrite albicostata* Fractions. *Journal of Life Science*. **20(10)**. 1505~1510(2010)
- Sung S. H., Kim E. S., Lee K. Y., Lee M. K., Kim Y. C. A new

- neuroprotective compound of *Ligustrum japonicum* leaves. *Planta medica*, **72(1)**, 62–64(2006)
- Takano H., Zou Y., Hasegawa H., Akazawa H., Nagai T., Komuro I. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases, *Antioxid Redox Signal*, **5(6)**, 789–794(2003)
- Kontogianni V. G., Exarchou V., Troganis A., Gerothanassis I. P. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy—omparison with HPLC methods, *Analytica Chimica Acta*, **635(2)**, 188–195(2009)
- Wang P., Zhu Q., Wu N., Siow Y. L., Aukema H, O K. Tyrosol attenuates ischemia-reperfusion-induced kidney injury via inhibition of inducible nitric oxide synthase, *J Agric Food Chem*, **61(15)**, 3669–3675(2013)
- Wang X., Ye X. l., Liu R., Chen H. L., Bai H., Liang X., Zhang X. D., Wang Z., Li W. l., Hai C. X. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases, *Chemico-Biological Interactions*, **184(3)**, 328–337(2010)
- Werner S., Nebojsa S., Robert W., Robert S., Olaf K. Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives, *MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY*, **41(8)**, 636–638(2003)

Woo K. W., Han J. Y., Choi S. U., Kim K. H., Lee K. R,  
Triterpenes from *Perilla frutescens* var. *acuta* and Their  
Cytotoxic Activity, *Natural Product Sciences*, **20(2)**,  
71-75(2014)

Zhao K., Fan H., Ungar I. A. Survey of halophyte species in China.  
*Plant Science*, **163** 491-498(2002)

[Http://www.usda.gov/](http://www.usda.gov/)

[Http://www.nature.go.kr/](http://www.nature.go.kr/)



부록

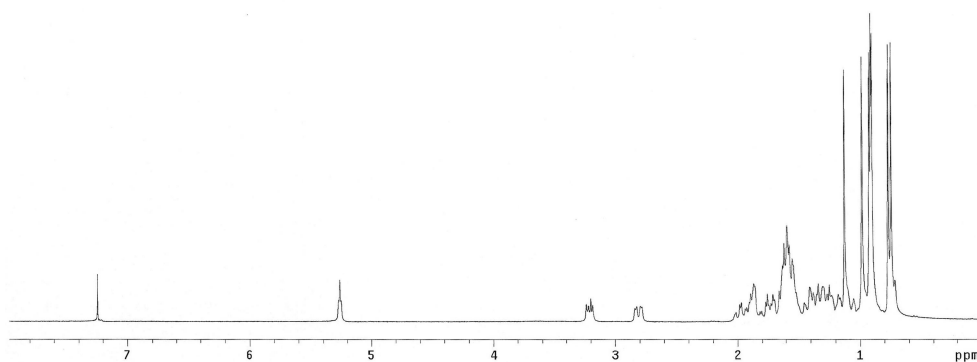


Fig. 33.  $^1\text{H}$  NMR Spectrum of compound 1.

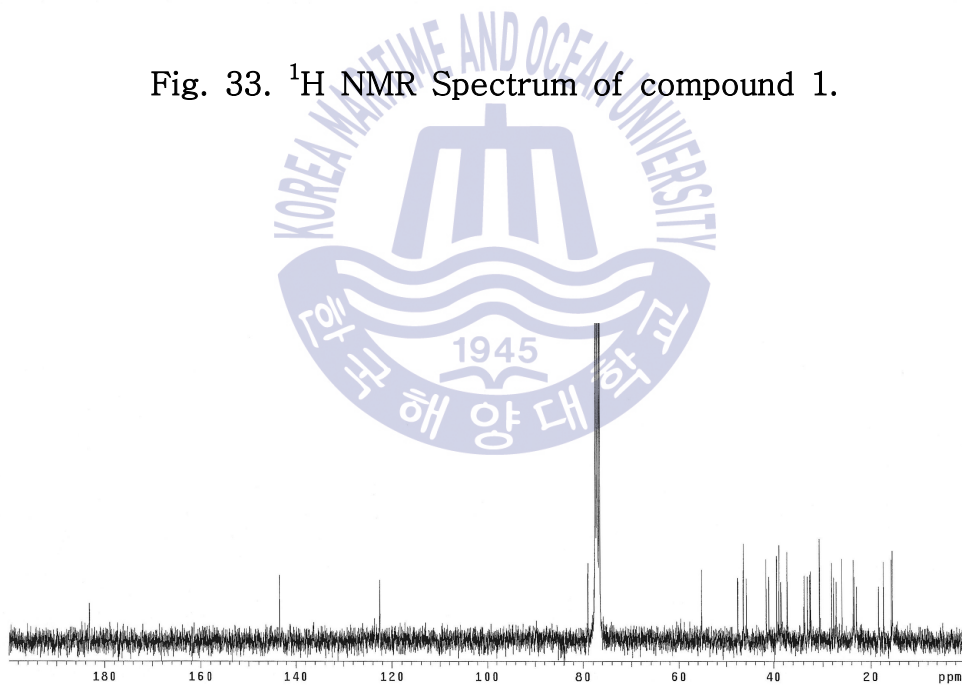


Fig. 34.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum of compound 1.

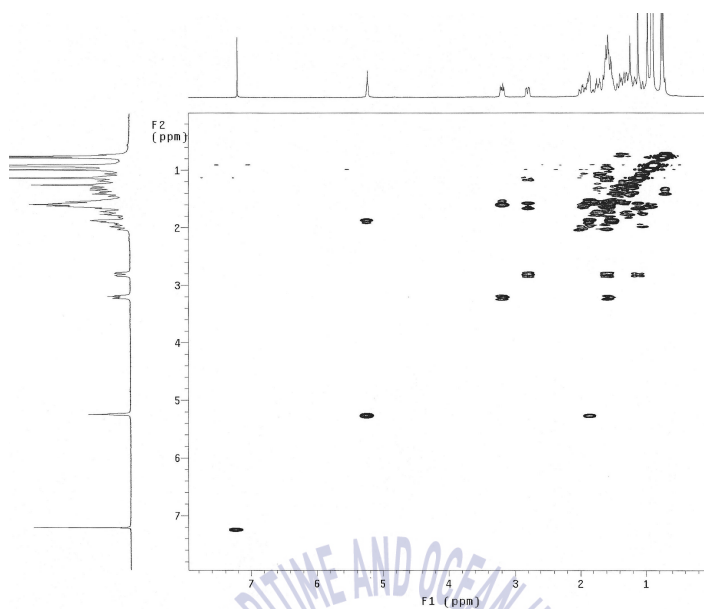


Fig. 35.  $^1\text{H}$  COSY Spectrum of compound 1.

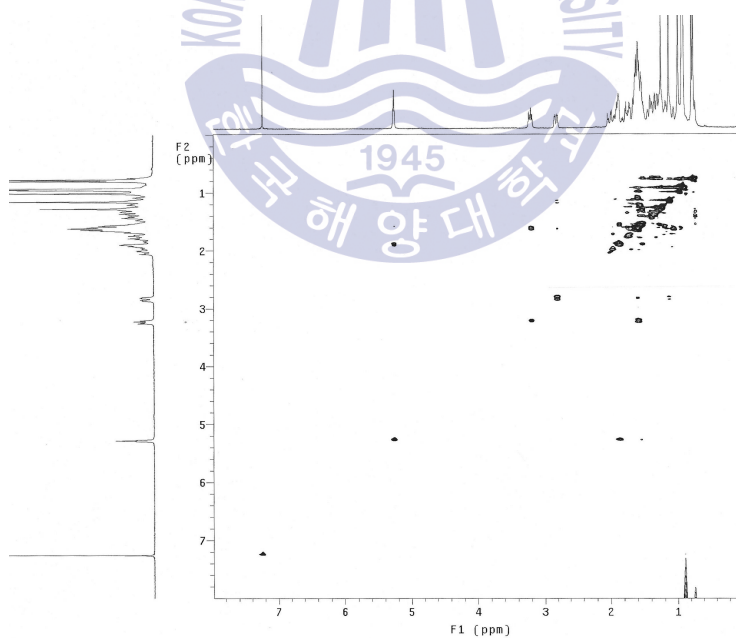


Fig. 36.  $^1\text{H}$  TOCSY Spectrum of compound 1.

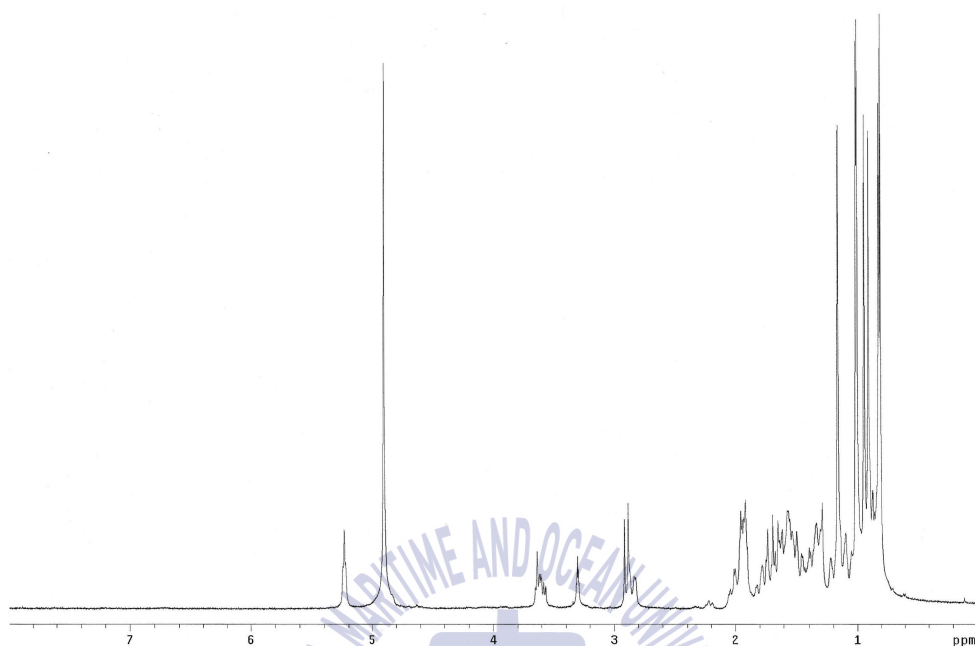


Fig. 37.  $^1\text{H}$  NMR Spectrum of compound 2.

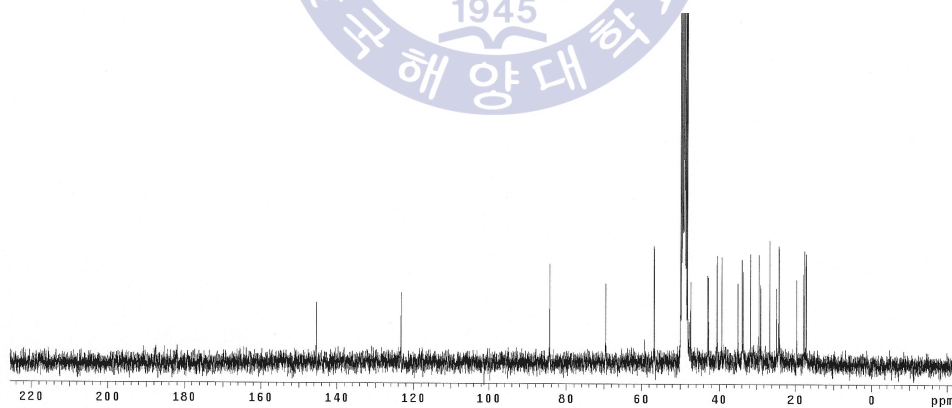


Fig. 38.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum of compound 2.



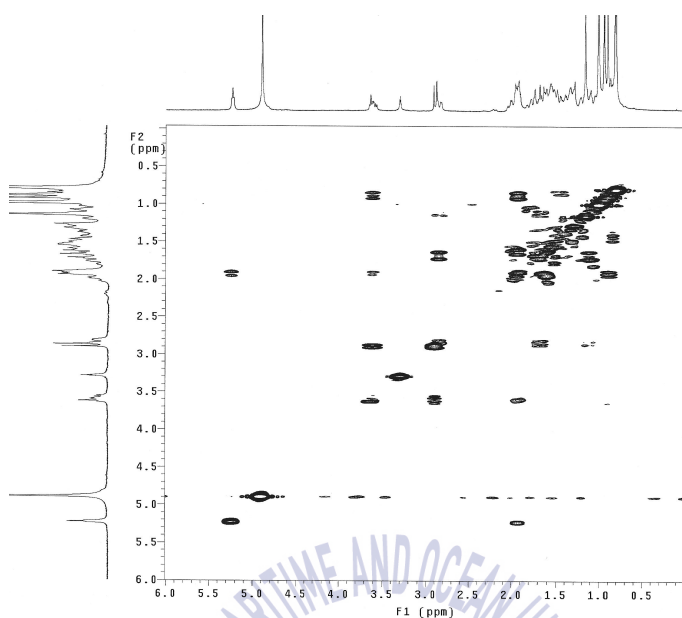


Fig. 39.  $^1\text{H}$  COSY Spectrum of compound 2.

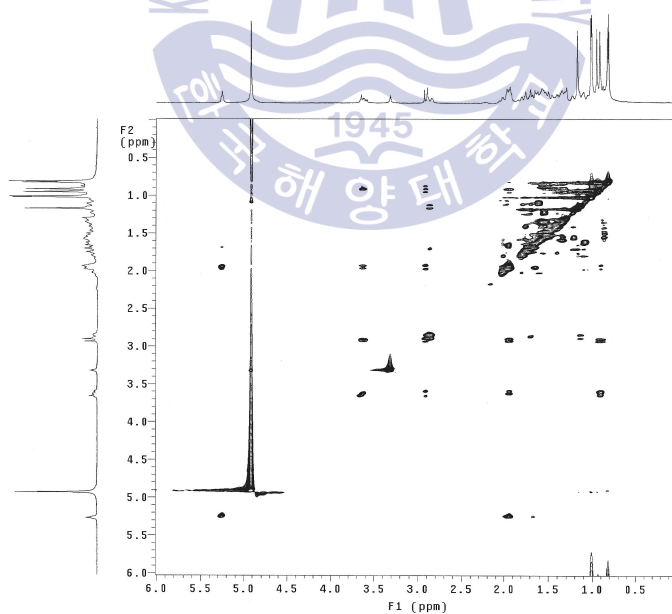


Fig. 40.  $^1\text{H}$  TOCSY Spectrum of compound 2.

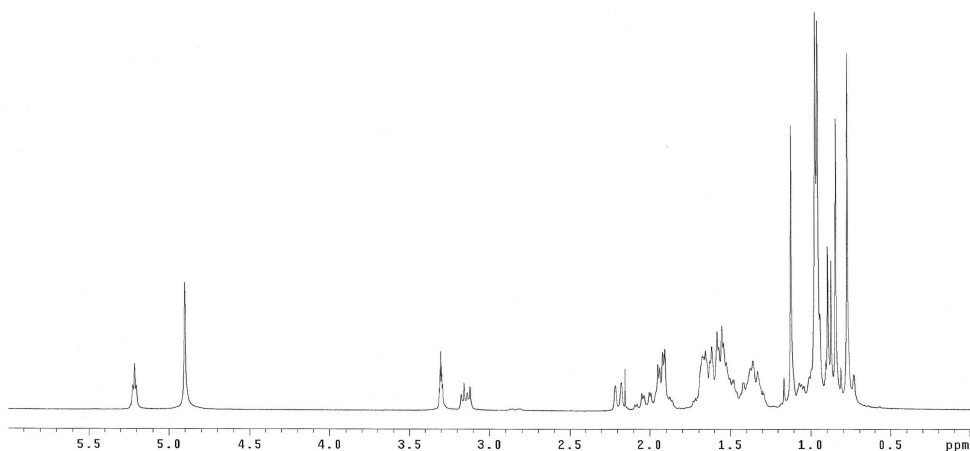


Fig. 41.  $^1\text{H}$  NMR Spectrum of compound 3.

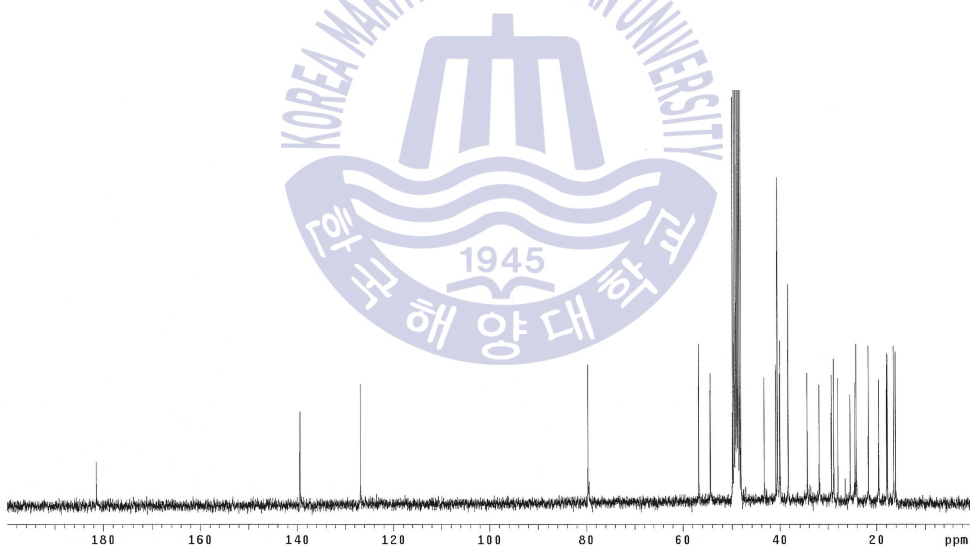


Fig. 42.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum of compound 3.

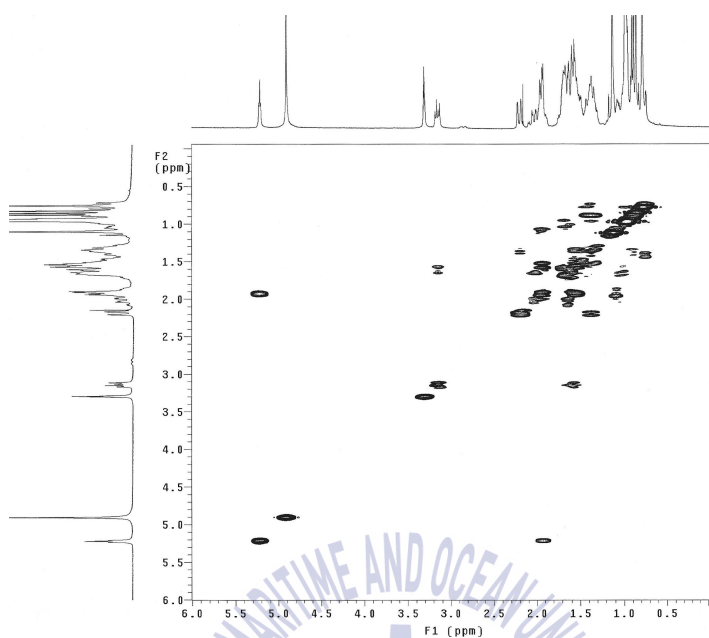


Fig. 43.  $^1\text{H}$  COSY Spectrum of compound 3.

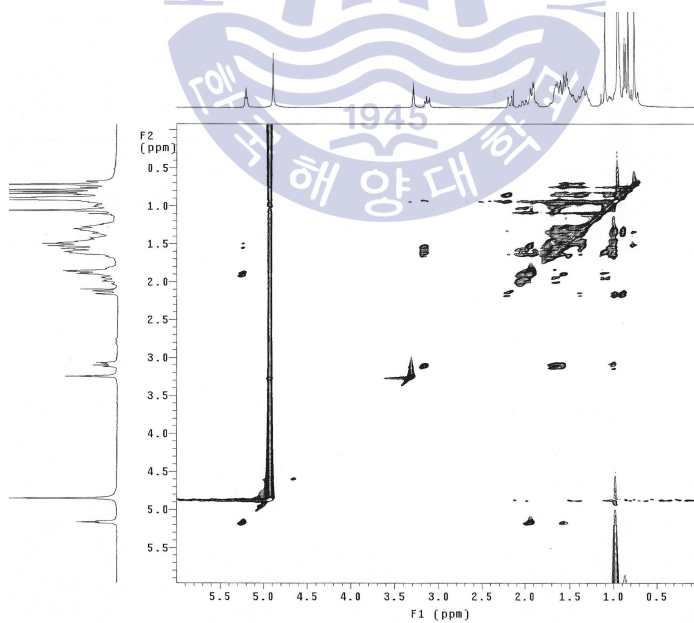


Fig. 44.  $^1\text{H}$  TOCSY Spectrum of compound 3.

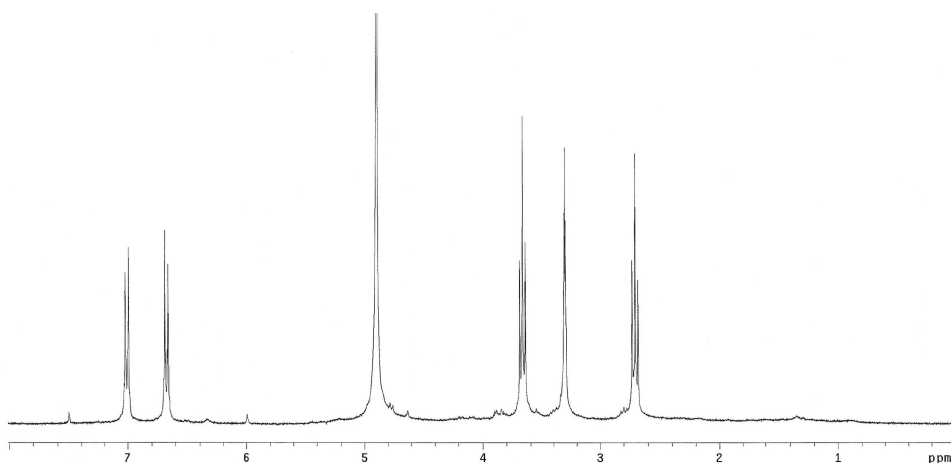


Fig. 45.  $^1\text{H}$  NMR Spectrum of compound 4.

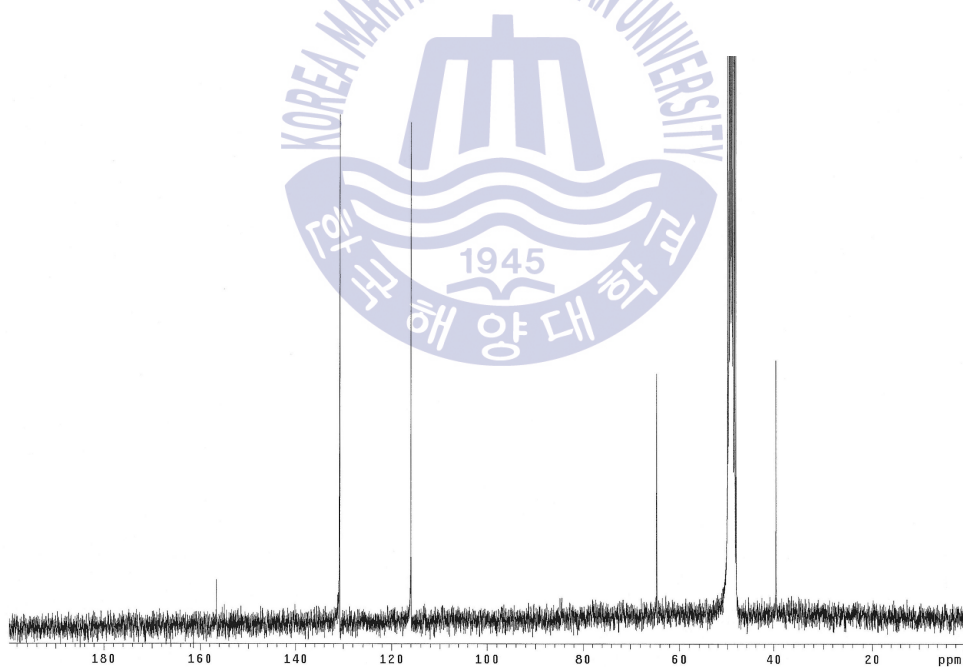


Fig. 46.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum of compound 4.

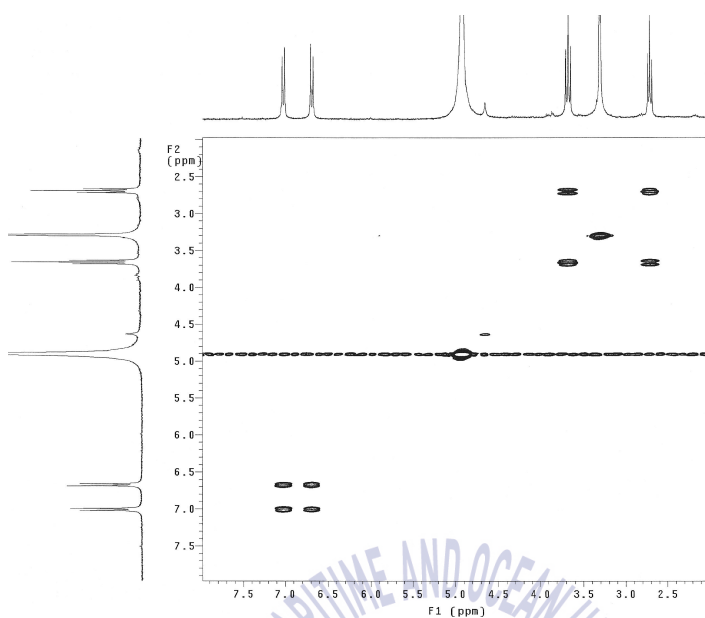


Fig. 47.  $^1\text{H}$  COSY Spectrum of compound 4.

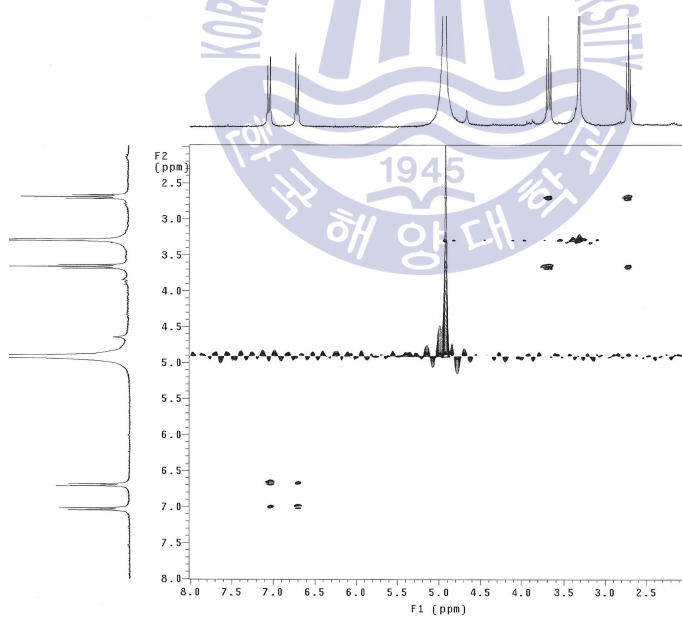


Fig. 48.  $^1\text{H}$  TOCSY Spectrum of compound 4.

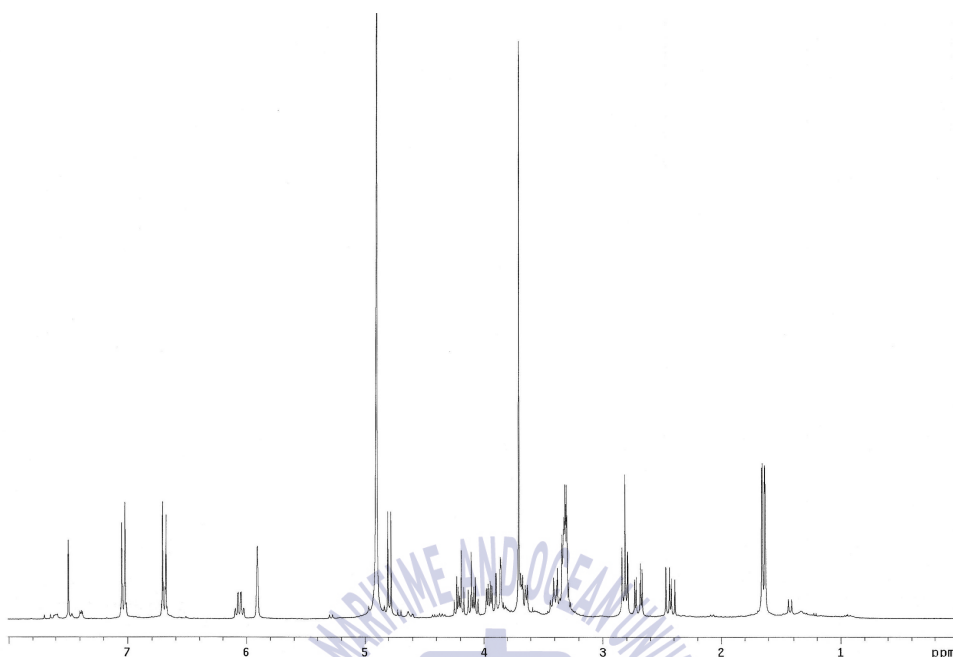


Fig. 49.  $^1\text{H}$  NMR Spectrum of compound 5.

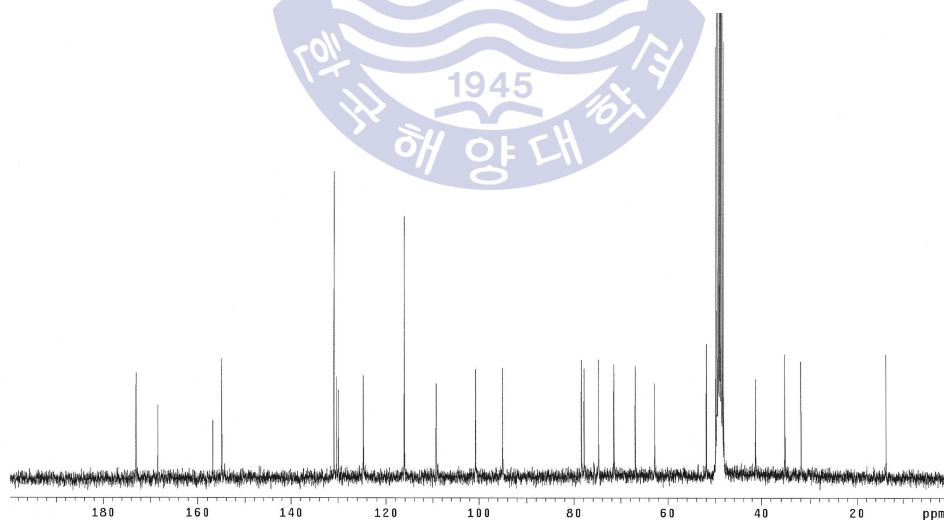


Fig. 50.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum of compound 5.

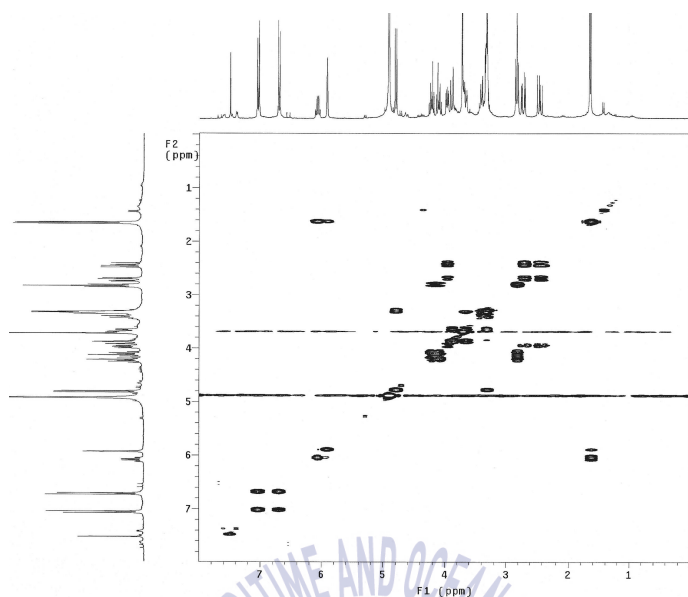


Fig. 51.  $^1\text{H}$  COSY Spectrum of compound 5.

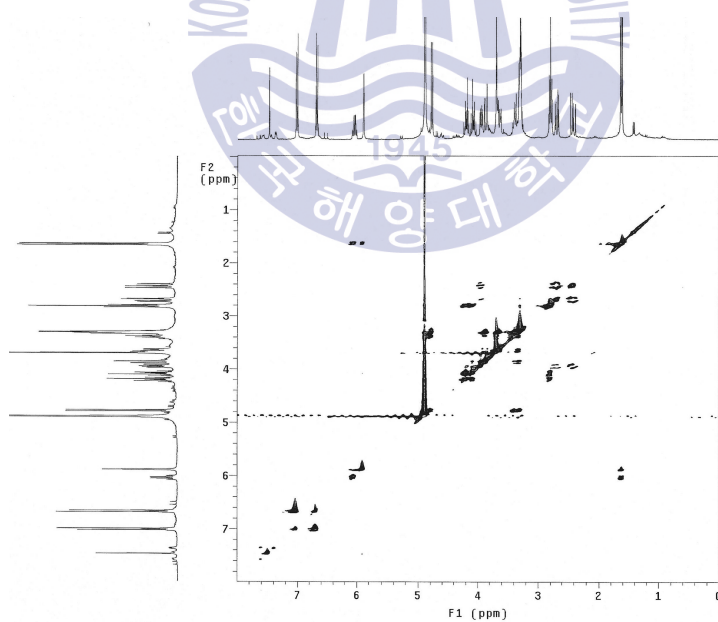


Fig. 52.  $^1\text{H}$  TOCSY Spectrum of compound 5.

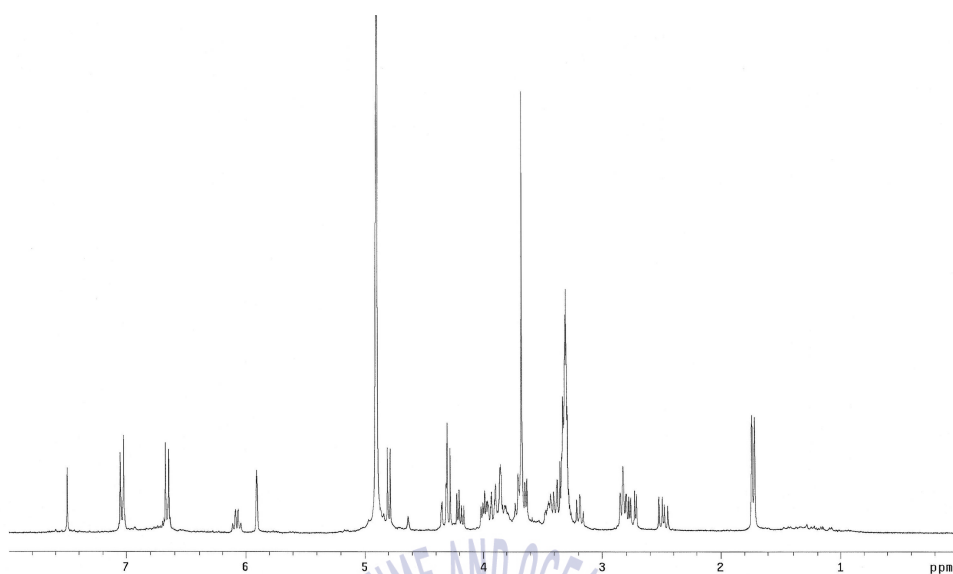


Fig. 53.  $^1\text{H}$  NMR Spectrum of compound 6.

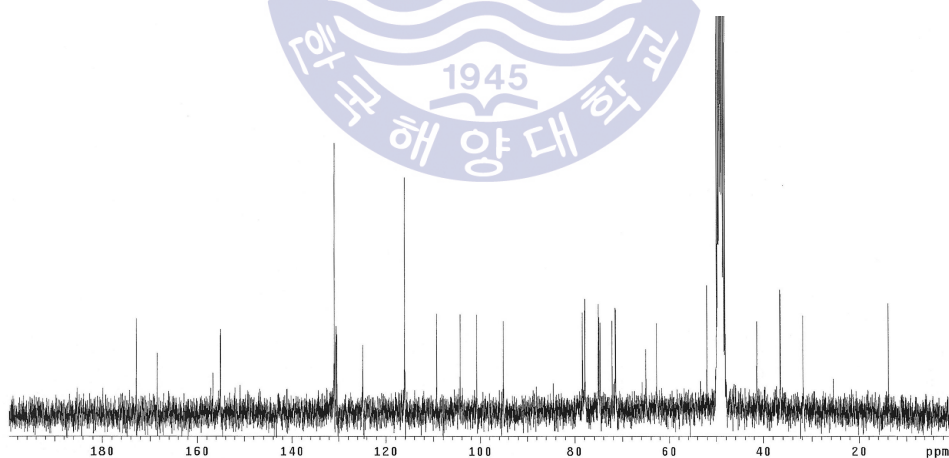


Fig. 54.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectrum of compound 6.



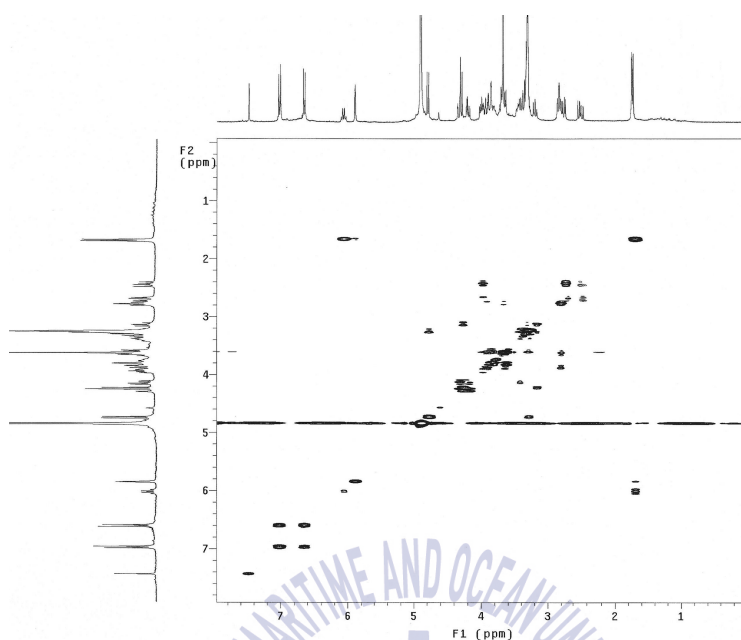


Fig. 55.  $^1\text{H}$  COSY Spectrum of compound 6.

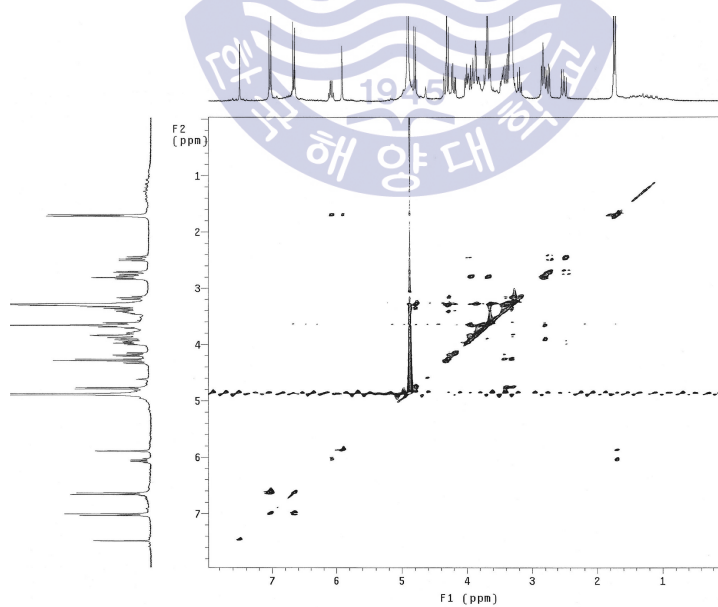
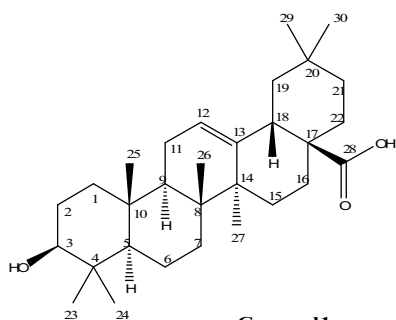
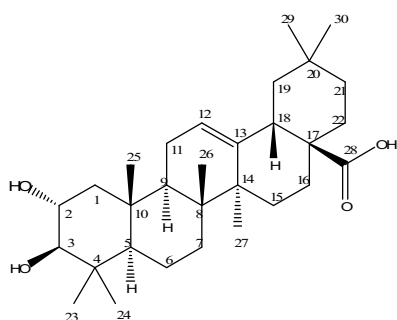


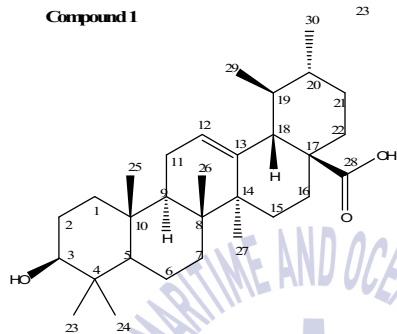
Fig. 56.  $^1\text{H}$  TOCSY Spectrum of compound 6.



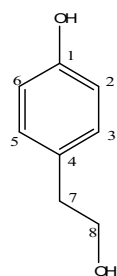
**Compound 1**



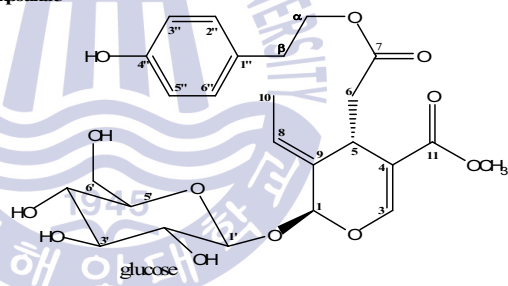
**Compound 2**



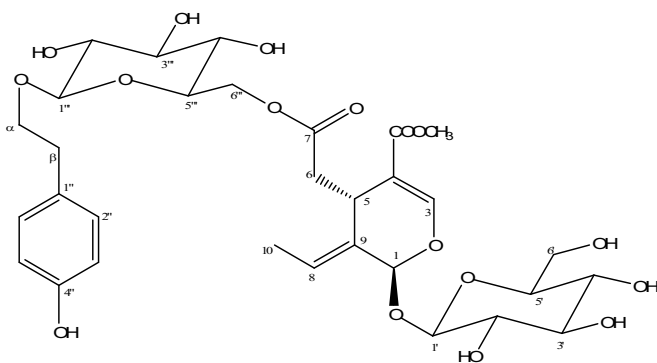
**Compound 3**



**Compound 4**



**Compound 5**



**Compound 6**